



**Universidade de Aveiro**  
**Ano 2014**

Departamento de Química

**Bruno José Monteiro  
Henriques**

**Relação entre a higienização de  
manipuladores e superfícies e a  
contaminação do produto final em  
pequenas indústrias alimentares**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Maria Gil, Professora associada com Agregação, do Departamento de química da Universidade de Aveiro e da Dra. Daniela Leite, Diretora Técnica do laboratório YourLab Segurança Alimentar na empresa VLM Consultores, S.A..

## **O júri**

Presidente

**Prof. Doutor João Manuel da Costa e Araújo Pereira Coutinho**  
Professor Associado com Agregação, Departamento de Química, Universidade de Aveiro

Arguente

**Professora Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo**  
Professora Associada com Agregação, Departamento de Química, Universidade de Aveiro

Orientador

**Prof. Doutora Ana Maria Pissarra Gil**  
Professora Associada com Agregação, Departamento de Química, Universidade de Aveiro.



## **Agradecimentos**

Não seria possível escrever esta tese de mestrado sem ajuda, força e partilha de conhecimento pela professora Doutora Ana Maria Pissarra Gil. Os meus sinceros agradecimentos pelo apoio da segunda supervisora, Doutora Daniela Costa Leite, a sua disponibilidade, dedicação e troca de conhecimentos foram impagáveis.

Agradeço à minha colega do laboratório Liliana Gomes, pelos ensinamentos práticos e pela disponibilidade ao longo do estágio.

Quero igualmente agradecer aos meus familiares pelo apoio contínuo e força, mesmo nos momentos mais difíceis.

Por fim, mas não por último agradeço à minha namorada Mariana Pinto pela sua presença, apoio constante e dedicação.

**palavras-chave** HACCP, higiene de manipuladores, higiene de superficies, higiene e segurança alimentar.

**resumo** As doenças de origem alimentar são provocadas, maioritariamente, por microrganismos e constituem uma das maiores preocupações de saúde pública a nível mundial. Os alimentos são os principais veículos de transmissão de doenças, o que se deve, principalmente, às más práticas de higiene e de fabrico. Nos estabelecimentos de restauração, a higiene e segurança alimentar é assegurada pela aplicação de boas práticas de higiene e de fabrico, bem como pela implementação do sistema *Hazard Analysis and Critical Control Points* (HACCP). A falta de conhecimento por parte dos manipuladores e, conseqüentemente, as más práticas de higiene e fabrico levam a que estes sejam uma das principais fontes de contaminação dos alimentos associados a doenças de origem alimentar.

Os objetivos deste estágio foram a descrição das atividades desempenhadas e a avaliação das análises efetuadas no decorrer do estágio, na empresa VLM consultores, mais especificamente, no laboratório YourLab S.A.. Além disso, pretendeu-se avaliar a relação entre a higienização de manipuladores e superfícies com a contaminação do produto final, em pequenas indústrias alimentares, onde foram utilizados dados de análises de 2011 a 2014.

Na análise a águas, verificou-se uma elevada percentagem de amostras consideradas “satisfatórias”, ou seja, dentro do limite estabelecido por lei. Especificamente em relação à análise dos parâmetros contagem de microrganismos a 22°C e 37°C, verificou-se um maior número de contaminação à temperatura 37°C, mostrando que, nas águas, a contaminação detetada é, maioritariamente, de origem fecal. Quanto à análise de alimentos, verificou-se que, na maioria, não foram detetados microrganismos patogénicos nas amostras de refeições e produtos alimentares analisados. Verificou-se um elevado número de contaminação de produtos confeccionados, o que revela que houve contaminação posterior à confeção, por contaminação cruzada, devido a más práticas de fabrico e higiene ou devido a incorreta confeção. Na análise de zaragatoas, verificou-se que, no parâmetro microrganismos a 30°C, existe uma maior contaminação nas zaragatoas de utensílios e superfícies, facto que se deve, possivelmente, a más práticas de higiene e de fabrico.

Dos resultados do trabalho referentes à avaliação da relação da contaminação de zaragatoas e alimentos recolhidos em simultâneo, verificou-se que 21,31% das amostras de produtos e zaragatoas estavam contaminadas em simultâneo, mostrando que existe uma falta de conhecimento de práticas de higiene e de fabrico por parte dos manipuladores. De entre os produtos contaminados relacionados com a contaminação de zaragatoas, verificou-se que esta correlação era maior em talhos, conseqüência da utilização de produtos frescos. Nas zaragatoas contaminadas relacionadas com a contaminação do produto, o nível de contaminação era maior nas zaragatoas de superfícies e utensílios, mostrando que a contaminação do produto pelos manipuladores ocorre mesmo com níveis baixos de contaminação.

Tendo em conta os resultados apresentados, conclui-se que o plano HACCP não é rigorosamente seguido, uma vez que, apenas 33,77% das amostras não apresentaram contaminação nem da zaragatoa nem do produto, pelo que urge a necessidade de uma verificação mais rigorosa e frequente do plano em questão. Essa verificação deve focar-se, principalmente, no nível de conhecimento das normas de higiene e segurança alimentar, bem como no respeito perante as mesmas, por parte dos manipuladores de alimentos.

**keywords** HACCP, handlers hygiene, surfaces hygienic, hygiene and food safety

**abstract** The Foodborne illnesses are caused mainly by microorganisms and constitute a major public health concern worldwide. Foods are the main vehicles of disease transmission, which is mainly due to poor hygiene practices and manufacturing. In catering establishments, hygiene and food safety are ensured by the application of good hygiene practices and manufacturing, as well as by the implementation of the Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) system. The lack of knowledge by handlers and therefore bad hygiene and manufacturing practices means that they are a major source of food contamination associated with foodborne illness.

The objectives of this thesis were to describe the activities performed and to evaluate the analyzes performed during the internship, in the company VLM consultants, more specifically, in the laboratory YourLab SA. In addition, it was intended to evaluate the relationship between the handlers and surfaces hygiene with contamination of the final product, in small food industries, where we used data analysis from 2011 to 2014.

In the water analyze, there was a high percentage of samples considered "satisfactory", in other words, below the limit set by law. Specifically regarding the analyze, count of microorganisms at 22°C and 37°C, there was a higher number of contaminating samples at 37°C, showing that, in water, the contamination detected was mainly of fecal origin. As for food analysis, it was found that most of the product samples were free of pathogenic microorganisms. There was a large number of contaminating processed products, which reveals that there was contamination after the confection by cross-contamination due to bad hygienic and manufacturing practices or due to incorrect confection. In the analysis of microorganisms at 30°C in swabs, it was found higher contamination of utensils and surfaces.

From the results of the work related to the evaluation of the contamination of food and swabs collected at the same time, it was found that 21.31% of product samples and swabs were contaminated at the same time, showing that there is a lack of knowledge of hygiene and manufacturing practices by handlers. Within the contaminated swabs related to the product contamination, it was found that this correlation was higher in butchers, as a result of the use of fresh products. Within the contaminated swabs related to the product contamination, the contamination level was higher in surfaces and utensils, indicating that the contamination of the product by handlers occurs even with low levels of contamination.

Given the results presented, we conclude that the HACCP plan is not followed strictly, only 33,77% of the products and swabs where not contaminated, so there is urgent need for a more rigorous and frequent checking of the plan in question. This verification should focus primarily on the level of knowledge of the rules of hygiene and food safety as well as respect towards them, by food handlers.



## Índice

Objetivos e Organização da Dissertação .....	1
Capítulo I. Revisão da Literatura.....	3
I.1    Perigos Alimentares .....	3
I.1.1  Perigos biológicos .....	3
I.1.2  Perigos químicos e físicos .....	7
I.2    Contaminação microbiológica dos alimentos .....	8
I.2.1  Principais doenças transmitidas por alimentos.....	8
I.2.2  Incidência e notificação de toxinfecções alimentares na Europa e em Portugal .....	11
I.2.3  Mecanismos de contaminação dos alimentos.....	12
I.2.4  Fatores que afetam o crescimento de microrganismos nos alimentos .....	14
I.3    Métodos de deteção dos principais microrganismos patogénicos encontrados nos alimentos.....	17
I.3.1  Principais métodos utilizados para a deteção e identificação de microrganismos .....	17
I.3.2  Principais testes bioquímicos .....	26
I.4    Legislação e sistemas de qualidade e segurança alimentar .....	30
I.4.1  Legislação europeia e nacional .....	30
I.4.2  Sistemas de qualidade e segurança alimentar .....	32
I.5    Higienização e contaminação em pequenas indústrias alimentares .....	38
I.5.1  Higiene em pequenas indústrias alimentares .....	38
II  Capítulo II. Parte Experimental .....	41
II.1    Serviços efetuados no Laboratório YourLab S.A. ....	41
II.2    Controlo de qualidade dos ensaios microbiológicos.....	42
II.2.1  Controlo de qualidade interno e externo .....	42
II.2.2  Controlo ambiental.....	43

II.3	Avaliação das amostras analisadas no decorrer do estágio .....	43
II.3.1	Análise de Alimentos .....	43
II.3.2	Análise de águas.....	50
II.3.3	Análise de zaragatoas .....	52
II.4	Caso de estudo – Avaliação da relação entre a higienização de manipuladores e superfícies e a contaminação do produto final em pequenas indústrias alimentares ..	54
II.4.1	Introdução – O problema em estudo .....	54
II.4.2	Tipos de amostras e estabelecimentos.....	54
II.4.3	Procedimento da análise de enumeração de microrganismos a 30°C nos alimentos e nas zaragatoas .....	55
II.5	Critérios microbiológicos considerados no estudo.....	56
Capítulo III.	Resultados e Discussão .....	59
III.1	Controlo ambiental.....	59
III.2	Avaliação das amostras analisadas no decorrer do estágio .....	60
III.2.1	Resultados dos alimentos analisados .....	60
III.2.2	Resultados das águas analisadas .....	67
III.2.3	Resultados das zaragatoas analisadas.....	70
III.3	Caso de estudo – Resultados da avaliação da relação entre a higienização de manipuladores e superfícies e a contaminação do produto final em pequenas indústrias alimentares .....	72
III.3.1	Avaliação da relação da contaminação das zaragatoas e o produto final.....	72
III.3.2	Percentagem de amostras em que houve contaminação das zaragatoas e do produto final, consoante o tipo de estabelecimento.....	74
III.3.3	Nível de contaminação das zaragatoas relacionada com a contaminação do produto final.....	76
III.3.4	Nível de contaminação dos produtos relacionados com a contaminação das zaragatoas.....	77
Conclusão	.....	78
Bibliografia	.....	81

## Índice de figuras

Figura 1- Na figura 1 está representada em forma de gráfico a velocidade de deterioração dos alimentos em função da aw, adaptado de (11).....	página 14
Figura 2- Colônias <i>Staphylococcus aureus</i> em meio <i>Baird-Parker agar</i> , adaptado da referência (10).....	página 25
Figura 3- Ilustração da reação do teste de coagulase: A, reação negativa e B e C, forte reação positiva, adaptado da referência (12).....	página 27
Figura 4- Ilustração da reação dada pela <i>Listeria spp.</i> no teste de CAMP, adaptado da referência (12).....	página 29
Figura 5- Galeria API 20E usando uma cultura pura de <i>E. coli</i> , adaptado da referência (10).....	página 30
Figura 6- Áreas abrangentes dos pré-requisitos, adaptado da referência (17).....	página 33
Figura 7- Árvore de decisão de PCC, adaptado da referência (4).....	página 36
Figura 8.- Esquema representativo da preparação das amostras para os diversos parâmetros.....	página 44
Figura 9- Esquema em síntese do método de pesquisa de <i>Salmonella spp.</i> segundo a norma de referência ISO 6579:2002 Designando-se BPW, <i>Buffered Peptone Water</i> ; RV broth, <i>Rappaport-Vassiliadis broth</i> ; MKTTn, <i>Mueller Kauffmann Tetrathionate Novobiocin Broth</i> ; XLD agar, <i>Xylose lysine deoxycholate</i> ; SS agar, <i>Salmonella e Shigella Agar</i> .....	página 46
Figura 10–Esquema em síntese da pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> segundo o procedimento padrão descrito na norma ISO 11290-1:1996 “Horizontal Method for the detection of <i>Listeria monocytogenes</i> ”. Sendo ALOA, <i>Agar Listeria Ottavani &amp; Agosti</i> .....	página 47
Figura 11– Esquema de procedimentos de método padrão para pesquisa de esporos de <i>Clostridium</i> sulfito-redutores, segundo a norma NP 2262:1986.....	página 48
Figura 12- Rampa de filtração usada na análise dos vários parâmetros em águas no laboratório Yourlab S.A.....	página 52

Figura 13– Esquema em síntese da contagem de microrganismos a 30° C segundo o procedimento padrão descrito na norma ISO 4833:2003 - Método horizontal para a contagem de colônias a 30°C. Sendo PCA, “ <i>Plate Count Agar</i> ” .....	página 55
Figura 14– Esquema em síntese da contagem de microrganismos a 30° C segundo o procedimento padrão descrito na norma ISO 18593:2004 –“ <i>Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs</i> “ e ISO 4833:2003 - Método horizontal para a contagem de microrganismos Contagem de colônias a 30°C.....	página 56
Figura 15- Análise de microrganismos a 30°C em alimentos confeccionados, percentagem das amostras em função dos diferentes limites críticos.....	página 60
Figura 16- Análise de microrganismos a 30°C em alimentos frescos, percentagem das amostras em função dos diferentes limites críticos.....	página 60
Figura 17- Análise de Enterobactérias em alimentos confeccionados, percentagem das amostras em função dos diferentes limites críticos.....	página 61
Figura 18- Análise de coliformes em alimentos confeccionados, percentagem das amostras em função dos diferentes limites críticos.....	página 61
Figura 19- Análise de coliformes em alimentos frescos, percentagem das amostras em função dos diferentes limites críticos.....	página 62
Figura 20- Análise de <i>E. coli</i> $\beta$ -glucuronidase em alimentos confeccionados, percentagem das amostras em função dos diferentes limites críticos.....	página 63
Figura 21- Análise de <i>E. coli</i> $\beta$ -glucuronidase em alimentos frescos, percentagem das amostras em função dos diferentes limites críticos.....	página 63
Figura 22- Análise de estafilococos coagulase positiva em alimentos confeccionados, percentagem das amostras em função dos diferentes limites críticos.....	página 64
Figura 23- Análise de Estafilococos coagulase positiva em alimentos frescos, percentagem das amostras em função dos diferentes limites críticos.....	página 64
Figura 24- Pesquisa de esporos <i>Clostridium</i> sulfito-redutores em alimentos confeccionados, percentagem das amostras em função dos diferentes limites críticos.....	página 66
Figura 25- Numero de amostras analisadas bem como os resultados obtidos para os diferentes parâmetros analisados no laboratório no decorrer do estágio em águas para consumo humano.....	página 68

Figura 26- Análise de microrganismos a 22°C em águas para consumo humano, percentagem das amostras em função dos diferentes limites críticos.....	página 70
Figura 27- Análise de microrganismos a 37°C em águas para consumo humano, percentagem das amostras em função dos diferentes limites críticos.....	página 70
Figura 28- Contagem de microrganismos a 30°C em Zaragatoas, a) Zaragatoas realizadas a manipuladores, b) Zaragatoas realizadas a utensílios e superfícies. Percentagem de amostras em função dos limites críticos.....	página 70
Figura 29- Contagem <i>Enterobactérias</i> em zaragatoas, a) zaragatoas realizadas a manipuladores, b) zaragatoas realizadas a utensílios e superfícies. Percentagem de amostras em função dos limites críticos.....	página 71
Figura 30- Análise das zaragatoas e produto, percentagem das amostras em que existe contaminação ou do produto ou da zaragatoa em função da contaminação do produto ou da zaragatoa ou de ambos.....	página 73
Figura 31- Percentagem de amostras em que se verificou contaminação simultânea do produto e da Zaragatoa em função dos tipos de estabelecimentos onde foram recolhidas.....	página 75
Figura 32- Percentagem de amostras em que se verificou contaminação simultânea do produto e das Zaragatoas em função dos limites críticos. a) Zaragatoa a manipuladores, b) Zaragatoa a superfície e utensílio.....	página 76
Figura 33- Nível de contaminação dos produtos em que se verificou contaminação simultânea do produto e das Zaragatoas.....	página 77

## Índice de tabelas

Tabela 1- Classificação dos microrganismos segundo o seu perigo e difusão, adaptada da referência (2).....	página 3
Tabela 2- Principais características das doenças em associação as principais bactérias patogénicas, adaptado da referência (4).....	página 9
Tabela 3- Número de surtos, casos, hospitalizações e mortes registadas em 2009, 2010 e 2011 na União Europeia segundo os relatórios anuais da EFSA, adaptado da referência (7).....	página 12

Tabela 4 - Principais fatores intrínsecos e extrínsecos para o desenvolvimento dos principais microrganismos patogénicos adaptado da referência (1).....	página 16
Tabela 5 – Processos internos e externos de controlo de qualidade realizados no laboratório YourLab S.A.....	página 42
Tabela 6 – Resumo de métodos de contagem de microrganismos em alimentos: princípio do método, meio de cultura utilizada, condições de incubação e norma correspondente.....	página 49
Tabela 7- Análises realizadas no decorrer do estágio a águas para consumo humano para os diversos parâmetros analisados.....	página 51
Tabela 8 – Resumo de métodos de enumeração de microrganismos em águas: princípio do método, meio de cultura utilizada, condições de incubação e norma correspondente.....	página 52
Tabela 9 – Resumo dos métodos de enumeração de microrganismos a zaragatoas: princípio do método, meio de cultura utilizada, condições de incubação, limite de deteção e norma correspondente.....	página 53
Tabela 10-Valores guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a consumir, onde * - Aplicável em produtos conservados no frigorífico; #-Equacionado caso a caso; NA – Não aplicável adaptado, da referencia (25).....	página 57

## **Abreviaturas, siglas e simbologia**

**ALOA** - *Agar Listeria Ottavani & Agosti*

**API** – *Analytical Profile Index*

**BPW** – *Buffered Peptone Water*

**BPF** – Boas Práticas de Fabrico

**BP** – *Baird Parker*

**BPH** – Boas Práticas de Higiene

**BRC** – *British Retail Consortium*

**CAMP** – Teste de *Christie, Atkins, Munch-Petersen*

**CCPs** – *Critical Control Points*

**CCS** -Contagem de células somáticas

**CDC** - *Center for Disease Control and Prevention*

**DDO** – Doenças de Declaração Obrigatória

**DNA**– Ácido desoxirribonucleico

**DGS** – Direção-Geral da Saúde

**DRBC** – *Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar*

**EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético

**ELISA** - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

**EFSA** – *European Food Safety Authority*

**EUA** – Estados Unidos da América

**FDA** – *Food and Drugs Administration*

**FAO**– *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

**GDH** – *Grupos de Diagnóstico Homogéneos*

**GMP** – *Good Manufacturing Practice*

**GHP** – *Good Hygiene Practices*

**HACCP** – *Hazard Analysis and Critical Control Points*

**ICMSF** – *International Commission on Microbiological Specification for Foods*

**IPSSs** - Instituições Particulares de Solidariedade Social

**ISO**– *International Organization for Standardization*

**IFS** – *International Featured Standards*

**MKTTn** - *Mueller Kauffmann Tetrathionate Novobiocin*

**MPNC**– *Most Probable Number Counts*

**MVT** - Mesófilos viáveis totais  
**NASA** - *National Aeronautics and Space Administration*  
**PCA** - *Plate Count Agar*  
**PCC** – Pontos críticos de controlo  
**PCR** - *Polimerase Chain Reaction*  
**RNA**– Ácido ribonucleico  
**RV** –*Rappaport-Vassiliadis*  
**SARA** – Sistema de Alerta e Resposta Apropriada  
**SS** –*Salmonella Shigella Agar*  
**SSOP** – *Sanitation Standard Operating Procedures*  
**TAC** – Toxinfecção Alimentar Colectiva  
**TBX** - *Tryptone Bile X-glucuronide*  
**TSYEA** - *Tryptone Soy Yeast Extract*  
**UE** – União Europeia  
**UFC** – Unidades Formadoras de Colónias  
**VRBL** –*Violet Red Bile Lactose Agar*  
**XLD** –*Xylose Lysine Deoxycholate Agar*  
**WHO** – *World Health Administration*  
**YEA** –*Yeast Extrat Agar*  
**a<sub>w</sub>**– Atividade da água  
**g** - Gramas  
**mL**– Mililitro  
**mV**- milivolts  
**°C** – Graus Celsius  
**kDa** - kilodaltons

## **Objetivos e Organização da Dissertação**

O principal objetivo do presente estágio, decorrido no laboratório de microbiologia *YourLab Segurança Alimentar*, consistiu na obtenção de experiência de trabalho, integrando o quotidiano de um laboratório de microbiologia alimentar. Foi possível experienciar a análise microbiológica de águas, zaragatoas e alimentos, desde a recolha, preparação da amostra, análise, contagem, testes bioquímicos de confirmação, quando necessários, até chegar aos resultados finais da análise, com o objetivo de avaliar se estes se encontram nos limites definidos por lei ou, no caso de estes não existirem, nos limites definidos pelo cliente. Os objetivos mais específicos do estágio baseiam-se na aquisição de conhecimentos relativos à legislação aplicável a empresas de segurança alimentar, normas relativas às análises, bem como, procedimentos realizados de acordo com a acreditação das análises efetuadas no laboratório, controlo de qualidade interno e externo do Laboratório e ensaios interlaboratoriais.

Para além dos objetivos relacionados com as tarefas desempenhadas no dia-a-dia do estágio, um dos objetivos foi analisar os resultados das amostras de águas, alimentos e zaragatoas analisadas no decorrer do mesmo, conforme a legislação vigente e, a partir desses resultados, verificar o nível de contaminação das amostras, verificar se a implementação do plano HACCP é realizada com sucesso e avaliar se existe uma diferença entre o nível de contaminação entre os produtos frescos e os produtos confeccionados, uma vez que estes são sujeitos a tratamento térmicos. Outro objetivo consistiu em avaliar a relação entre a higienização de manipuladores e superfícies e a contaminação do produto final em pequenas indústrias alimentares, através dos dados das análises obtidos no decorrer do estágio e de anos anteriores. Além disso, pretendeu-se avaliar em que tipo de estabelecimento a correlação é maior, qual o nível de contaminação das zaragatoas relacionada com a contaminação do produto final e se esta contaminação é superior em zaragatoas realizadas a manipuladores ou a zaragatoas realizadas a superfície e utensílios.

De um modo geral, esta dissertação encontra-se dividida em 3 capítulos. O primeiro consiste numa revisão bibliográfica, de modo a contextualizar os conhecimentos relativos à realização da tese. O segundo capítulo diz respeito à parte experimental, a qual se encontra dividida em duas partes: a primeira parte refere-se a atividades desempenhadas no estágio, análises efetuadas e respetivos procedimentos, segundo as normas padrão e a segunda refere-

se aos procedimentos do caso-estudo e à avaliação da relação da higienização de manipuladores e superfícies e a contaminação do produto final em pequenas indústrias alimentares. Por fim, no terceiro capítulo a primeira parte que diz respeito à análise dos resultados obtidos no decorrer do estágio segundo a legislação vigente. Uma segunda parte que diz respeito à avaliação da higienização de manipuladores e superfícies e contaminação do produto final em pequenas indústrias alimentares.

# Capítulo I. Revisão da Literatura

## I.1 Perigos Alimentares

Os perigos alimentares dividem-se em 3 categorias: perigos biológicos, químicos e físicos. Neste capítulo serão aprofundados os perigos biológicos, nomeadamente os microrganismos patogénicos encontrados nos alimentos, uma vez que são estes que apresentam uma maior preocupação a nível de saúde pública.

### I.1.1 Perigos biológicos

Os perigos biológicos são os mais importantes, quando comparados com os físicos e químicos. A presença destes perigos nos alimentos pode ser indicadora de más práticas por parte dos manipuladores ou de uma confeção inadequada dos alimentos.

A maioria dos alimentos são ótimos meios para o desenvolvimento de microrganismos, devido à sua elevada atividade de água ( $a_w$ ) e boa gama de pH, o que pode resultar na contaminação dos mesmos e, consequentemente, estes podem também ser um veículo para a transmissão de doenças (1).

As doenças de origem alimentar provocadas por microrganismos são uma das preocupações de saúde pública a nível mundial. Estima-se que 90% das doenças transmitidas por alimentos sejam provocadas por microrganismos e que a sua transmissão resulte maioritariamente do uso de práticas incorretas. Embora se conheçam mais de 250 tipos de microrganismos causadores de doença, apenas alguns ocorrem frequentemente, segundo a *National Adviser Comitte on Microbiological Criteria for Foods*, comité estabelecido em 1988. O principal objetivo deste comité é abranger questões de saúde pública, nomeadamente em relação à segurança e inocuidade dos alimentos nos EUA, incluindo o desenvolvimento de critérios microbiológicos na avaliação da segurança dos alimentos. Os perigos alimentares podem ser classificados em três classes, segundo o seu perigo e difusão, conforme descrito na tabela 1 (2).

Tabela 1 - Classificação dos microrganismos segundo o seu perigo e difusão, adaptada da referência (2)

Risco severo	Risco Moderado/ Alta difusão	Risco Moderado/Difusão limitada
<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Salmonella typhi</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Clostridium perfringens</i>
Virus da hepatite A e E	<i>Shigella</i> spp	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Brucella abortus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Vibrio cholera non-01</i>

Os microrganismos patogénicos incluem as bactérias, vírus, fungos e parasitas. No entanto, de entre estes, as bactérias patogénicas são as que apresentam maior prevalência nas doenças de origem alimentar, representando cerca de 90% das causas de doenças de origem alimentar (3).

#### **I.1.1.1 Bactérias**

As bactérias são microrganismos unicelulares com uma estrutura muito simples, o que favorece a sua rápida replicação, caso encontrem condições favoráveis para tal. Nalguns casos, apenas 20 minutos são suficientes para que o número de bactérias duplique (3). O modelo de distribuição das bactérias nos alimentos tem vindo a alterar-se devido a mudanças de produção, confeção e distribuição dos mesmos. Atualmente, as bactérias são isoladas de alimentos onde não se encontravam há 20 anos atrás. Exemplo disso é o que acontece com as espécies de *Salmonella*, bactéria que, tradicionalmente, está associada aos ovos ou a carnes de frango, pato ou peru, mas que, ultimamente, tem sido notificada em alimentos tão diversos como a carne de porco ou de vaca, especiarias, camarão, bivalves, queijo, entre outros (4).

Há meio século atrás, bactérias como *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocitogenes* e *E.coli* 0157:H7 não eram ainda reconhecidas. Além disso, os organismos vivos e os microrganismos patogénicos estão em constante modificação. Por exemplo, a *E. coli* 0157:H7, originalmente designada de bactéria dos hambúrgueres e presente na carne de vaca mal cozinhada, tem vindo a aparecer em cidra de maçã, lacticínios, entre outros alimentos. Atualmente, sabe-se que a *Yersinia enterocolitica* e a *Listeria monocitogenes* conseguem sobreviver a temperaturas de refrigeração. Outro exemplo pode ser observado para a *Salmonella enteritidis*, que por muitos anos não representava perigo e considerava-se que o interior do ovo era estéril, mas em 1989 descobriu-se que galinhas infetadas com *Salmonella* passavam a infeção para os ovos tornando-os perigosos para o consumo humano (3). Importa ainda realçar, acerca das modificações crescentes destes microrganismos, a crescente resistência aos antibióticos que se verifica atualmente (3). De um modo geral, as bactérias crescem em ambientes com elevada atividade de água, isto é, valores entre 0.86 a 0.99, e, por norma, preferem ambientes com pH neutro e um intervalo de temperatura entre os 20 e os 45°C. Outra característica que define algumas bactérias é a formação de estruturas mais resistentes, os esporos, que se formam em condições adversas para as células, como a falta

de nutrientes ou temperaturas elevadas. De facto, os esporos apresentam uma elevada resistência ao calor e às radiações, assim como aos agentes desinfetantes, o que se deve aos elevados conteúdos de cálcio e de ácido dipiconílico ou ácido 2,6-dicarboxílico piridina, que complexa com o cálcio e forma um polímero que é extremamente resistente ao calor. Nos alimentos, as bactérias esporuladas mais importantes pertencem aos géneros *Bacillus* e *Clostridium* (5,6). As bactérias patogénicas podem causar doença através de três mecanismos:

**Infeção:** Ingestão de alimentos que contêm microrganismos vivos prejudiciais, como a *Salmonella*, *Shigella* e *Bacillus cereus*. Após a ingestão algumas bactérias danificam diretamente o intestino e outras resistem ao ambiente ácido do estômago e passam para o intestino delgado, começando a proliferar até atingirem um número que cause a doença (4,5).

**Intoxicação:** Ingestão de alimentos que contêm toxinas, mesmo que os microrganismos que lhes tenham dado origem tenham sido eliminados. Exemplos de toxinas são as produzidas pelo *Clostridium botulinum*, a enterotoxina do *Staphylococcus aureus* e as micotoxinas (toxinas produzidas por fungos). A bactéria *Staphylococcus aureus* encontra-se presente no pó, água, animais e em humanos e, embora a temperatura elimine as bactérias, as toxinas sobrevivem, pois são mais resistentes (4,5).

**Toxinfecção:** Corresponde ao caso da infeção mediada por toxinas produzidas após a ingestão do alimento. Alguns dos microrganismos capazes de gerar este mecanismo são as bactérias *Vibrio cholerae* e *Clostridium perfringens* que entram no intestino, sobrevivem ao ambiente ácido do estômago e, posteriormente, são capazes de produzir toxinas. A bactéria *Clostridium perfringens*, através da sua forma esporulativa, sobrevive a condições extremas, tal como o armazenamento a baixas temperaturas e a elevadas temperaturas (4,5).

### I.1.1.2 Vírus

Os seres humanos são hospedeiros para um elevado número de vírus que se reproduzem nos intestinos e, de seguida, são excretados nas fezes. A transmissão de vírus ocorre através do contacto com esgotos ou água contaminados por fezes ou através do contacto direto com material fecal humano. Os alimentos mais frequentemente associados a doenças virais transmitidas por alimentos são os moluscos crus ou mal cozidos (ostras, mariscos, mexilhões e vieiras), dado que os vírus patogénicos humanos são muitas vezes descarregados no rio e oceano através de esgotos tratados e não tratados. Assim, os mariscos

filtram esses contaminantes, armazenando-os dentro dos seus tecidos comestíveis. Os crustáceos cultivados e colhidos a partir de águas poluídas têm sido implicados em alguns surtos de doenças virais. A outra fonte principal de transmissão é feita através de trabalhadores infetados que têm falta de higiene pessoal e contaminam os alimentos. Portanto, a adequada lavagem das mãos e uso de uma fonte de água limpa são vitais para controlar a propagação do vírus de origem alimentar (3). A falta de bons métodos laboratoriais na deteção de vírus tem sido um dos principais problemas, uma vez que, a inexistência de métodos fáceis, rápidos e de baixo custo impossibilita os cientistas de estudar os vírus (2). Os vírus mais frequentemente implicados em doenças de origem alimentar são os da hepatite A, hepatite E, os rotavírus, os vírus da família Norwalk, os enterovírus e os astrovírus, vírus que possui um genoma constituído por uma cadeia simples de ácido ribonucleico RNA e a sua estrutura ao microscópio assemelha-se, muitas vezes, a uma estrela, devido às partículas virais que possui (2).

#### **I.1.1.3 Parasitas: vermes e protozoários**

Os vermes e os protozoários são parasitas, ou seja, são organismos que vivem beneficiando de uma associação com um hospedeiro. Portanto, vivem à superfície ou no interior do hospedeiro, prejudicando-o para a obtenção dos nutrientes que necessita (2). Os parasitas que estão associados a doenças de origem alimentar dividem-se em três grupos: protozoários (seres unicelulares, na maioria heterotróficos com mobilidade especializada) intestinais, protozoários de tecidos e helmintes ou vermes de tecidos. As principais vias de transmissão destes organismos são a ingestão de águas contaminadas por via fecal-oral ou por falta de higiene no manuseamento dos alimentos, assim como, tecidos de animais mal cozinhados (3). Entre os principais parasitas causadores de doenças de origem alimentar encontram-se: *Trichinella spiralis*, *Trichuris trichiura*, *Acantamoeba* spp., *Anasakis simplex*, *Ascaris lumbricoides*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*, *Eustrongylides* spp., *Giardia lablia*, *Nanophyetus* spp., *Cyclospora cayetanensis*, *Diphyllobothrium* spp., *Sarcocystis hominis/suihominis*, *Taenia solium*, *Toxoplasma gondii* (3).

#### **I.1.1.4 Fungos**

As leveduras e bolores compõem o Reino dos fungos. Em comparação com as bactérias, estes apresentam um menor crescimento a pH neutros e a uma atividade de água

elevada, sendo que encontram condições ótimas de crescimento em alimentos ácidos e com baixa atividade de água (limite de 0,6). Por isso, entre os alimentos mais perecíveis de contaminação encontram-se os frutos, vegetais, cereais, queijos, alimentos salgados, entre outros. As leveduras apenas são responsáveis pela deterioração dos alimentos, não estando associadas a qualquer risco para a saúde pública (3,6). Os bolores e os fungos filamentosos podem ser perigosos quando produzem micotoxinas. Dentro dessas espécies produtoras de micotoxinas encontram-se o *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, sendo que estas são, na sua maioria, estáveis termicamente e de difícil remoção dos alimentos (5). Na indústria agrícola, a presença de bolores e fungos é natural, mas deve ser controlada, de modo a evitar a formação de micotoxinas. Os fungos também podem apresentar perigo no caso das rações para animais, pois podem ser contaminadas com fungos produtores de micotoxinas e, como a maioria dos animais não tem uma alimentação muito diversificada, aumenta a sua suscetibilidade a obter problemas de saúde (5).

### **I.1.2 Perigos químicos e físicos**

Os perigos químicos incluem químicos provenientes de agricultura, químicos adicionados aos alimentos no seu processamento, ou químicos naturalmente presentes na sua composição. Os químicos que se encontram nesta classe são pesticidas, herbicidas, inseticidas, fertilizantes, antibióticos, aditivos alimentares, toxinas naturais e alergénicos (3).

Os perigos físicos são os perigos que apresentam menor impacto na segurança alimentar, no entanto, revelam algum interesse. Estes são, geralmente, fáceis de detetar e prevenir através de boas práticas de fabrico. Os perigos físicos que ocorrem mais frequentemente são: vidros, madeiras, pedras, metais, materiais de isolamento ou de revestimento, ossos, plásticos e objetos de uso pessoal. A contaminação dos alimentos, com estes objetos pode decorrer desde as matérias-primas até ao decurso das atividades de armazenamento e transformação a que vão ser sujeitos (2). Como se pode verificar, os perigos físicos mais frequentes nos alimentos são os objetos que não estão ligados às matérias-primas e que podem ter origem nas instalações, nas atividades de manutenção, nos equipamentos ou nos utensílios. Os operadores que, direta ou indiretamente, manipulam os alimentos e os materiais de embalagem nas atividades de higienização dos equipamentos e instalações também originam estes perigos (3). Normalmente, a presença de objetos estranhos nos produtos alimentares não apresenta um risco muito grave para a saúde do

consumidor. No entanto, se os objetos forem de pequenas dimensões e cortantes, podem causar desde pequenos danos na boca do consumidor até problemas mais graves, como cortes ou perfurações em órgãos internos, podendo até levar a graves hemorragias (3,4).

## **I.2 Contaminação microbiológica dos alimentos**

### **I.2.1 Principais doenças transmitidas por alimentos**

O *Center for Disease Control* (CDC), dos Estados Unidos, define doença transmitida por alimentos como um incidente em que duas ou mais pessoas apresentam os mesmos sintomas de doença, após ingestão de um mesmo alimento e as análises epidemiológicas apontam o alimento como origem da doença, podendo também ocorrer um único caso (5). A gama de doenças provocadas por alimentos está em contínua modificação e existe variação da prevalência de certas doenças conforme as épocas do ano. Atualmente, é cada vez mais frequente o aparecimento de novos microrganismos, o que se explica pelo facto de estes microrganismos não serem cultiváveis anteriormente, pois a tecnologia está a desenvolver-se de tal modo que estão disponíveis melhores testes laboratoriais que permitem identificar microrganismos que anteriormente não eram detetáveis. A constante modificação do ecossistema em que vivemos, bem como os novos hábitos de produção e de consumo fazem com que estes passem a ser detetáveis em alimentos, o que não acontecia anteriormente (2).

As doenças de origem alimentar são frequentes mas a sua etiologia é, muitas vezes, dificilmente avaliada devido à falta de conexão com o alimento ingerido, bem como devido à variabilidade interindividual. A enumeração dos alimentos ingeridos recentemente pode ajudar, mas é necessário ter em conta que a doença pode ocorrer nas horas seguintes ou vários dias depois. Assim, é necessário entrevistar muitas pessoas e que estas se lembrem do que comeram durante uma semana, o que é extremamente improvável. Além disso, o conhecimento dos sintomas e do período de incubação das doenças é essencial na identificação do microrganismo patogénico causador da doença para, se necessário, tomar as medidas antes de uma confirmação laboratorial (3,5). Estas doenças dependem da dose infetante, isto é, do número mínimo de microrganismos necessários para causar doença, o que pode variar de indivíduo para indivíduo e que se relaciona com grupos de risco, como as crianças e os idosos (4). Na tabela 2, apresentam-se, de forma sucinta, as principais características das doenças em associação com as principais bactérias patogénicas que podem estar presentes nos alimentos (4).

Tabela 2. Principais características das doenças em associação as principais bactérias patogênicas, adaptado da referência (4).

<b>Bactérias</b>	<b>Período de Incubação</b>	<b>Doença Causada</b>	<b>Sintomas</b>	<b>Duração dos Sintomas</b>	<b>Alimentos Associados</b>
<i>Salmonella typhi</i>	6 a 48 h	Bacteremia (presença de bactérias na corrente sanguínea), febre tifoide	Febre, náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia, cefaleias	1 a 2 dias	Carne crua, frango e peru, leite e derivados, pescado, camarão, molhos e temperos, sobremesas
<i>Salmonella paratyphi</i>		Bacteremia, febre entérica			recheadas com cremes, manteiga
<i>Escherichia coli</i> <i>enterohemorrágica</i>	3 a 9 dias	Colite hemorrágica, com possível desenvolvimento de síndrome hemolítico-urémico	Cólica intensa, dores abdominais, diarreia (no Princípio aquosa tornando-se sanguinolenta). Menos frequente, vômito e febre baixa	8 dias	Carne bovina, crua ou mal passada, queijo e leite cru
<i>Escherichia coli</i> <i>enteroinvasiva</i>	12 a 72 h	Disenteria	Dores abdominais, diarreia, vômitos, febre, calafrios e mal-estar generalizado	2 a 9 dias	Queijo
<i>Escherichia coli</i> <i>enteropatogênica</i>	12 a 36 h	Diarreia infantil	Diarreia aquosa, desidratação e desequilíbrio hidroeletrólítico		Leite, carne e frango crus
<i>Escherichia coli</i> <i>enterotoxigênica</i>	12 a 36 h	Gastroenterite	Diarreia		Saladas e vegetais crus
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2h a 4 dias	Gastroenterite	Diarreia profusa, dores abdominais, náuseas, vômitos, cefaleias, febre e calafrios	2 dias e meio	Pescado cru ou mariscos contaminados

<i>Listeria monocytogenes</i>	3 a 7 dias	Listeriose	Septicemia, meningite, meningo-encefalite, encefalite, infecção intra-uterina ou cervical em gestantes. Os primeiros sintomas são semelhantes aos de uma gripe, incluindo febre persistente. Em alguns casos, náuseas, vômitos e diarreia	2 dias e meio	Leite, queijos (principalmente pasta mole), gelados, vegetais, frango cru e cozido, carnes cruas, enchidos, pescado cru e fumado  Em alimentos enlatados e embalados em vácuo, etc. Milho enlatado, pimenta, feijão-verde, sopas, beterraba, espargos, cogumelos, azeitonas, atum, frango, fígado de galinha, carnes frias, presunto, lagosta, pescado salgado e fumado
<i>Clostridium botulinum</i>	18 a 36 h	Botulismo	Fadiga extrema, fraqueza, tonturas, visão dupla, dificuldade progressiva em falar e engolir, boca seca, perda de consciência, paragem respiratória e cardíaca		
<i>Bacillus cereus</i>	10 a 22 h	Forma emética	Náuseas e vômitos	24 a 48 h	Alimento com amido (e.g. arroz, batatas, legumes, feijão, legumes cozidos, puré de batata), arroz e massas
		Forma diarreica	Diarreia profusa, dores abdominais e náuseas		Carne, vegetais, pescado e sopas
<i>Clostridium perfringens</i>	8 a 24 h	Intoxicação alimentar	Náuseas, dores abdominais, diarreia e vômito em alguns casos	24 h	Produtos cárnicos
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 a 4 h	Intoxicação estafilocócica	Náuseas, vômitos, dores, abdominais, prostração e, em alguns casos, diarreia Dores de cabeça, câibras, alterações temporárias da <b>pressão</b> arterial.		Carnes e derivados, aves, ovos, atum, saladas, bolos com recheio, natas, leite e derivados

## **I.2.2 Incidência e notificação de toxinfecções alimentares na Europa e em Portugal**

A variedade e extensão das doenças de origem alimentar é tal que é difícil proporcionar dados exatos sobre a sua incidência ou prevalência, por isso, fazer uma estimativa global da magnitude real do problema é praticamente impossível (4).

Apenas uma pequena parte das doenças de origem alimentar chega a ser conhecida pelas autoridades de saúde pública, uma vez que a maioria dos países não possui um sistema de notificação de doenças de origem alimentar. Cerca de 5 a 20% da população sofre de doenças de origem alimentar, embora os casos notificados alcancem apenas cerca de 10% em relação à incidência real nos países industrializados. Estima-se que na União Europeia, a incidência anual de surtos se situe entre os 6 a 80 milhões de casos (4).

Portugal não possui um sistema nacional de vigilância e controlo de doenças de origem alimentar, sendo que o número de registos de incidências é relativamente baixo, ao contrário de outros países europeus (4). Apesar disso, existem várias entidades, como as Doenças de Declaração Obrigatória (DDO), da Direção Geral de Saúde (DGS), o sistema de Alerta e Resposta Apropriada da Direção Geral da Saúde (SARA) e os Grupos de Diagnóstico Homogéneos (GDH) dos hospitais, que consiste no agrupamento em grupos homogéneos de doentes com características clínicas e recursos associados idênticos (6).

Em 2001, a DGS realizou uma circular normativa (N.º14/DT de 9/10/2001), uma vez que, até essa altura, só eram declarados casos que se inseriam nas Doenças de Declaração Obrigatória (DDO), o que não previa a notificação de surtos, fazendo com que as Toxinfecções Alimentares Coletivas (TAC) fossem subavaliadas. Esta norma teve como objetivo fornecer as orientações referentes à resposta a ser dada pelos serviços de saúde, nomeadamente no que respeita à investigação epidemiológica. No entanto, as TAC não são publicadas em local público, sendo apenas publicados relatórios das DDO. Estes relatórios são a melhor forma de obter informações sobre a vigilância e controlo de doenças de origem alimentar nacional, através dos relatórios anuais da *European Food Safety Authority* (EFSA) (6).

A EFSA é responsável pela análise dos dados sobre as zoonoses, doenças ou infeções transmissíveis dos animais aos humanos. A infeção pode ser contraída através da ingestão de alimentos contaminados ou diretamente dos animais. Também analisa dados de surtos de origem alimentar apresentados pelos Estados-Membros em conformidade com a Diretiva

2003/99/EC6 (7), sendo dados mais recentes os relativos a 2011, como é mostrado na tabela 3.

Tabela 3- Número de surtos, casos, hospitalizações e mortes registadas em 2009, 2010, 2011 e 2012 na União Europeia segundo os relatórios anuais da EFSA, adaptado da referência (8,9).

<b>Ano</b>	<b>Nº de surtos</b>	<b>Nº de casos</b>	<b>Nº de hospitalizações</b>	<b>Nº de mortes</b>
2009	5550	48964	4356	46
2010	5262	43373	4695	25
2011	5648	69553	7125	93
2012	5363	55453	5118	41

Em 2011 foram reportados 5648 surtos de origem alimentar na União Europeia originando 7125 hospitalizações e 93 fatalidades. Verificou-se um aumento de surtos em 2011 devido a um aumento do número de casos de *E. coli* enterohemorrágica, principalmente na Alemanha, fazendo com que o número de casos e de fatalidades aumentasse mais que o costume. Segundo o relatório da EFSA relativo à “vigilância das zoonoses e dos agentes zoonóticos”, a *Salmonella* foi a principal causa de surtos em 2011 seguida das toxinas bacterianas, *Campylobacter* e vírus o mesmo verifica-se em 2012. Em relação aos alimentos contaminados, as principais fontes de surtos foram os ovos e os seus derivados, as refeições mistas e os peixes (7,8,9). Em 2012 foram reportados 5363 surtos de origem alimentar, originando 5118 hospitalizações e 41 fatalidades. Verifica-se uma redução quando comparado com o ano 2011 verificando-se um aumento na tendência do número de surtos e consequentemente fatalidades. Em 2012 o número de salmoneloses em humanos diminuiu 4,7% quando comparado com os dados de 2011. Verificaram-se ainda 198 fatalidades reportadas por listeriose em 2012, verificando-se o mais elevado desde de 2006 (9).

### **I.2.3 Mecanismos de contaminação dos alimentos**

Quando os alimentos são manipulados de forma incorreta podem ocorrer contaminações cruzadas, colocando em risco a saúde dos consumidores. A contaminação cruzada caracteriza-se pela transferência de microrganismos ou de substâncias prejudiciais à saúde humana (4). Os veículos responsáveis por essa transferência podem ser:

- As mãos do operador: por exemplo, contacto das mãos com alimentos crus, seguido do contacto com alimentos confeccionados e não lavagem das mãos entre utilizações de diferentes alimentos ou tarefas;

- Os salpicos de saliva e espirros ou tosse provenientes do operador;

- Os utensílios (facas, tabuas de corte), superfícies de trabalho, fardas ou outros equipamentos: por exemplo, utilização da mesma faca para cortar alimentos crus e confeccionados, sem haver uma higienização entre as duas utilizações, o que também acontece no caso das bancadas;

- Deficiente acondicionamento dos alimentos: por exemplo, alimentos contaminados em fase de descongelamento, numa câmara de refrigeração, não estão devidamente acondicionados e libertam sucos que contaminam outros alimentos (1).

Os tipos de contaminação cruzada incluem: mão para a superfície, superfície para a mão, comida para a mão, mão para a comida e combinações destes. Muitos estudos mostram que várias bactérias, incluindo *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp, sobrevivem nas mãos, esponjas e utensílios, ocorrendo por horas e dias após o contato inicial (10). Qualquer superfície que entre em contacto com os trabalhadores infetados durante a preparação da comida pode facilmente ser contaminada. A taxa de transferência de microrganismos de alimentos crus para alimentos cozidos através das mãos vai de 0,005 a 100% (11). Para além da contaminação cruzada, existem outros fatores que contribuem para a contaminação direta e indireta dos alimentos, em indústrias alimentares:

- Matérias-primas contaminadas
- Manipulações inadequadas que originam contaminações cruzadas
- Armazenagens em frio e arrefecimentos impróprios
- Incorretas práticas de descongelação
- Má higiene pessoal
- Pessoal manipulador infetado
- Má higiene das instalações, equipamentos e utensílios
- Panos da loiça/esponjas utilizados para diversas funções
- Alimentos preparados com muita antecedência
- Armazenagem à temperatura ambiente
- Distribuição demorada

#### I.2.4 Fatores que afetam o crescimento de microrganismos nos alimentos

Os alimentos possuem características próprias ou adicionadas que favorecem ou inibem o crescimento de microrganismos, as quais se dividem em fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos consistem nas propriedades físicas e químicas do próprio alimento, nomeadamente a atividade da água, pH e nutrientes. Já os extrínsecos relacionam-se com o ambiente onde se encontra o alimento, tal como a temperatura (12).

Relativamente à quantidade de água disponível num alimento, a sua expressão é feita através do parâmetro atividade da água,  $a_w = \frac{p}{p_o}$ , onde p é a pressão do vapor da água na substância, e  $p_o$  é a pressão do vapor de água pura à mesma temperatura. A  $a_w$  pode ser controlada de diversas maneiras, nomeadamente pela adição de solutos, por processos de secagem, liofilização, congelamento, entre outras

A maioria dos alimentos frescos (carnes, peixe, frutos e vegetais) têm valores de  $a_w$  entre 0.97 e 0.99, valores esses próximos das condições ótimas para o crescimento da maioria das bactérias. Quando a  $a_w$  é inferior a 0.85, o crescimento da maioria das bactérias patogénicas encontra-se controlado. Na maioria dos casos, para valores de  $a_w$  abaixo de 0.90, a produção de toxinas é inibida, exceto para o *Staphylococcus aureus*. Já os fungos e leveduras desenvolvem-se em valores de  $a_w$  superiores, entre 0.60 a 0.70. Quando a  $a_w$  é inferior a 0.60, os fungos não são capazes de germinar nem produzir micotoxinas, contudo mantêm a sua viabilidade e podem retomar o metabolismo normal e crescimento assim que as condições voltarem a ser favoráveis. Na figura 1 está representada, em forma de gráfico, a velocidade de deterioração dos alimentos em função da  $a_w$  (1).

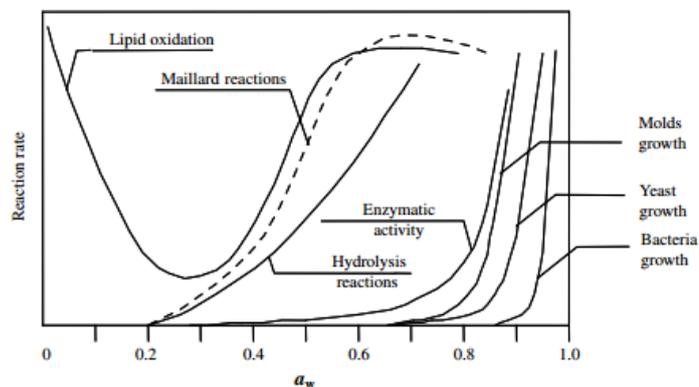


Figura 1- Velocidade de deterioração dos alimentos em função da  $a_w$ , adaptado de (13).

O pH é outro fator importante a ter em conta. No seu estado natural, a maioria das carnes, peixes e vegetais são ligeiramente ácidos, a maioria dos frutos é moderadamente ácido e um número limitado de alimentos é alcalino, por exemplo a clara de ovo. A redução do pH de um alimento contribui para a diminuição do crescimento microbiano, sendo que, a um pH abaixo de 4.6, a maioria das bactérias patogénicas não se multiplica.

Os fungos desenvolvem-se em valores de pH entre 2.5 a 9.5, as leveduras apresentam um pH ótimo de crescimento entre 4.5 a 6 e os bolores de 3.5 a 4.0 (1). Os alimentos ácidos têm valores de pH inferiores a 4.5, sendo este o limite mínimo para o crescimento da maioria dos microrganismos patogénicos. Porém, algumas vezes, bactérias sobrevivem a valores inferiores, tal como a *Listeria monocitogenes*, *Salmonella* spp. e *E. coli O157:H7* (12).

O potencial de oxidação-redução, isto é, a capacidade em milivolts (mV) de um meio aceitar ou doar eletrões, é outro fator importante na contaminação dos alimentos. As reações de oxidação-redução são essenciais para os microrganismos na obtenção de energia por fosforilação oxidativa. Em sistemas aeróbios, como a carne picada e algumas frutas, o potencial atinge valores de 300 mV, o que permite o crescimento de microrganismos tipicamente aeróbios, como a *Pseudomonas* spp. e bolores. Em sistemas anaeróbios, o potencial apresenta valores de -150 mV e, portanto, é onde as bactérias lácticas e *Clostridium* spp. conseguem sobreviver (12).

A temperatura é um aspeto crucial quando nos referimos ao crescimento bacteriano, uma vez que todos os microrganismos possuem uma gama de temperatura de crescimento ótima. A maioria dos microrganismos patogénicos encontra condições ótimas de crescimento entre os 30°C e os 45°C, mas existem bactérias patogénicas que sobrevivem a baixas temperaturas, como *Yersinia enterocolitica* e *Listeria monocytogenese*, que podem sobreviver e crescer a temperaturas de refrigeração. Entre as bactérias patogénicas, o *Staphylococcus aureus* é das mais resistentes a elevadas temperaturas e pode sobreviver a condições de temperatura de 60°C durante 15 minutos (2,9).

Para os fungos, a gama de temperaturas ótima situa-se entre os 20 e os 30°C. Alguns fungos conseguem desenvolver-se a temperaturas de refrigeração acima dos 0°C, como o *Penicillium roquefort*, e também a temperaturas elevadas, como o *Aspergillus fumigatus*, que sobrevive a temperaturas de 55°C (1).

Outro parâmetro a ter em conta é a composição atmosférica. De facto, a utilização de atmosferas modificadas é um método de preservação muito utilizado, pois inibe o

crescimento bacteriano através do uso de gases, como o dióxido de carbono, ozono e oxigénio ou uma combinação destes (2). Os microrganismos aeróbios precisam de oxigénio para viver, enquanto os anaeróbios vivem mesmo na ausência de oxigénio, tal como a bactéria *Clostridium botulinum* (4). A maioria das bactérias patogénicas é anaeróbia facultativa, ou seja, consegue crescer na presença ou ausência de oxigénio, tendo uma preferência. Nesta incluem-se a família das *Enterobacteriaceae*, *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, entre outras (12). Na tabela 4 descrevem-se os principais fatores intrínsecos e extrínsecos para o desenvolvimento dos principais microrganismos patogénicos.

Tabela 4 - Principais fatores intrínsecos e extrínsecos para o desenvolvimento dos principais microrganismos patogénicos, adaptado da referência (1).

Perigos	Parâmetros				
	T <sub>min</sub> (°C)	T <sub>máx</sub> (°C)	pH <sub>min</sub>	pH <sub>máx</sub>	a <sub>w</sub> min
<i>Bacillus cereus</i>	4	55	4.3	9.3	0.92
<i>Campylobacter jejuni</i>	30	45	4.9	9.5	0.987
<i>Clostridium botulinum</i>	3.3	45	5	9	0.97
<i>Clostridium botulinum</i>	10	48	4.6	9.0	0.94
<i>Clostridium perfringens</i>	10	52	5.0	9.0	0.93
<i>Escherichia coli</i>	6.5	49.4	4.0	9.0	0.95
Enterotoxina estafilocócica	10	50	4.76	9.02	0.86
<i>Listeria monocytogenes</i>	-0.4	45	4.4	9.4	0.92
<i>Salmonella spp.</i>	5.2	46.2	3.7	9.5	0.94
<i>Shigella spp.</i>	6.1	47.1	4.8	9.34	0.96
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	50	4	10	0.83
<i>Staphylococcus aureus</i> – toxina	10	48	4	9.8	0.85
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5	45.3	4.8	11	0.94
<i>Vibrio cholerae</i>	10	43	5	10	0.97
<i>Vibrio vulnificus</i>	8	43	5	10	0.96
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-1.3	42	4.2	10	0.945

### **I.3 Métodos de detecção dos principais microrganismos patogénicos encontrados nos alimentos**

#### **I.3.1 Principais métodos utilizados para a detecção e identificação de microrganismos**

Atualmente, as análises microbiológicas realizadas recorrendo à microbiologia tradicional são ainda as mais utilizadas por laboratórios da União Europeia, devido ao seu baixo custo. Existem outros métodos mais rápidos, mas com equipamentos muito dispendiosos (14).

Os métodos considerados “convencionais” são aqueles que se baseiam na contagem de unidades formadoras de colónias (UFC) após a indução do crescimento num meio de cultura. Entre os métodos mais usados encontra-se o método de sementeira por incorporação, que permite a contagem de UFC, sendo a análise feita pela adição de quantidades conhecidas (normalmente 1 ml de volume de solução mãe ou diluições) a um meio à base de agar, derretido numa placa de Petri.

Outro método “convencional” utilizado é o método de sementeira à superfície, em que o inóculo é espalhado à superfície do meio, por espalhamento, em quantidades, normalmente, inferiores a 100 µl. Este meio é bastante útil e é usado em microrganismos estritamente aeróbios, de modo a que o crescimento ocorra à superfície, e quando os meios são opacos, o que impossibilitaria a contagem das colónias se estas não crescessem à superfície. O *Most Probable Number Counts* (MPNC), um método menos utilizado, consiste, basicamente, na análise de organismos viáveis, inferida da examinação de múltiplas culturas, efetuadas com varias diluições. Por fim, determina-se em que diluições se observa ou não o crescimento (13,14).

Em águas, no caso de alguns parâmetros microbiológicos, utiliza-se o método da filtração por membrana. Os filtros da membrana possuem poros com diâmetro compreendidos entre 0,43-0,47µm, para a maioria dos isolamentos microbianos. Assim, ocorre a passagem de água, retendo apenas as bactérias, sendo que algumas membranas possuem grelhas impressas para facilitar a contagem de colónias. De seguida, os filtros podem ser inoculados à superfície de meios seletivos, seguindo-se uma inoculação em estufas, a temperaturas e duração adequadas à análise que se está a efetuar (15).

Nos alimentos, os principais microrganismos analisados são os microrganismos a 30°C, a análise de coliformes, Bolors e Leveduras a 25°C, *Enterococcus* spp., *Escherichia*

*coli.*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus* coagulase positivos.

a) Contagem de microrganismos a 30°C, 22°C e 37°C

A contagem dos microrganismos a 30°C fornece informações acerca dos critérios de higiene de processos, pois considera-se que esta temperatura é ótima para o crescimento dos microrganismos presentes em alimentos e superfícies.

As temperaturas de 22°C e 37°C estão associadas à análise das águas. A contagem dos microrganismos à temperatura de 22°C fornece indicações de higiene geral, feita a análise à temperatura ambiente. A contagem de microrganismos à temperatura 37°C é indicadora de microrganismos de contaminação fecal, pois estes são mais resistente a altas temperaturas devido ao seu habitat natural, o intestino de humanos e animais.

Na análise são usados meios não seletivos, como *Plate Count Agar* (PCA), que permitem o crescimento de uma vasta gama de microrganismos e *Yeast Extract Agar* (YEA) utilizado na análise a águas (10).

b) Contagem e pesquisa de Coliformes

O termo coliforme representa um grupo de espécies de bactérias de vários géneros que apresentam muitas características comuns: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e, provavelmente, *Aeromonas* e *Serratia*. São todas Gram-negativas, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas, fermentadoras de lactose com produção de ácidos (ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico) e produção de gás, normalmente dióxido de carbono. Este grupo de bactérias encontra-se nas fezes de humanos, animais de sangue quente, aves e na natureza. As análises a estes microrganismos são feitas, tanto em alimentos, como em águas (10,11).

O meio mais utilizado é o *Violet Red Bile Lactose Agar* (VRBL), que contém a presença simultânea de sais de violeta cristal e de sais biliares, os quais inibem as bactérias Gram-positivas. A fermentação da lactose com produção de ácido mostra-se através da cor vermelha do indicador de pH (12).

c) Contagem de Enterobactérias

As Enterobactérias são uma família constituída por bacilos Gram-negativos, aeróbios e anaeróbios facultativos, oxidase negativos, fermentadores de glucose e produtores de catálase, enzima que destrói peróxidos tóxicos que se iriam acumular durante o metabolismo aeróbico (10).

Os principais géneros desta família são *Citrobacter*, *Edwarddsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia* e *Klebsiella*, *Morganella* e *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* e *Yersinia* (10,11).

A distribuição das Enterobactérias é ubiqüitária na natureza, podendo ser encontradas no solo, água, plantas, bem como na flora intestinal humana. Estão normalmente presentes em alimentos crus e, como são pouco tolerantes, ao calor deviam estar ausentes em alimentos processados com calor. Como tal, a sua presença em alimentos cozinhados mostra uma contaminação pós tratamento térmico (16).

Os métodos recomendados para detetar coliformes, coliformes fecais e *E. coli* baseiam-se na capacidade destas espécies para fermentarem a lactose. Em contraste, alguns agentes patogénicos entéricos não fermentam lactose, assim como a maioria dos sorotipos de *Salmonella* spp. (16). O meio de cultura utilizado é rico em glucose e a sua fermentação resulta em acidificação do meio, revelada pela cor vermelha da colónia, resultado da mudança de cor do indicador de pH (vermelho neutro) e pela precipitação dos ácidos biliares em torno das colónias. O meio mais utilizado, *Violet Red Bile Glucose Agar* (VRBG), além das características mencionadas acima, contém sais violeta cristal e os sais biliares que inibem as bactérias Gram-positivas (14).

d) Contagem de Bolores e Leveduras a 25°C

A análise de bolores e leveduras é feita em alimentos com baixa  $a_w$  e pH ácido, como os vegetais, legumes e cereais. Como estes microrganismos apresentam a capacidade de produção de micotoxinas tóxicas para o homem, é importante fazer uma avaliação destes nos alimentos, avaliando, nomeadamente a higienização dos processos (10,11). O meio seletivo "*Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar*" (DRBC) é o mais usado. Este meio contém triptona e glucose, para garantir o crescimento das leveduras e bolores, e antibióticos para reforçar a seletividade do meio, ou seja, para não permitir o crescimento da maioria dos contaminantes bacterianos (14).

e) Contagem *Enterococcus* spp.

O género *Enterococcus* é constituído por bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos. Morfologicamente podem apresentar-se em cocos (forma esférica) isolados, em pares ou em forma de coco-bacilos. Além disso, não apresentam motilidade, são microrganismos não produtores de catalase, anaeróbios facultativos e apresentam uma elevada resistência a agentes físicos, o que lhes permite sobreviver a ambientes hostis (16). A presença do género *Enterococcus* em humanos é detetada, principalmente, no aparelho digestivo e urinário, bem como em animais (pássaros e insetos). Entre as espécies reconhecidas, várias são encontrados no intestino de seres humanos, animais para alimentação e aves, incluindo as espécies de *Enterococcus faecalis*, *faecium*, *durans*, *gallinarum*, *avium*, e *hirae*.

Assim, estes microrganismos podem encontrar-se em diferentes alimentos através da contaminação fecal ou através da água, vegetação e equipamentos, sendo que o seu valor como indicador de contaminação fecal é questionável (10,11). Para o isolamento de *Enterococcus* spp., o meio seletivo utilizado possui sais biliares e esculina, que por sua vez reage com o citrato de amónio férrico para formar um composto de coloração castanho-preto (11,12).

f) Contagem e pesquisa de *Escherichia coli*

A bactéria *E. coli* pertence à família das Enterobactérias. Esta bactéria Gram-negativa é não produtora de citocromo oxidase, fermentadora de lactose com formação de gás, produtora de catalase e não formadora de esporos. Encontra-se no intestino humano, sendo que a maioria das estirpes não são patogénicas. No entanto, existem estirpes que libertam toxinas que provocam intoxicações alimentares (16). Existem 4 tipos de *E. coli* com base nas suas propriedades de virulência: *E. coli* enteropatogénica, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enterotoxigénica e *E. coli* enterohemorrágica. Os primeiros 3 tipos não são causadores comuns de doenças transmitidas por alimentos em países desenvolvidos, mas são uma importante causa de diarreia infantil em países menos desenvolvidos. Já a *E. coli* enterohemorrágica, particularmente associada com o sorotipo O157: H7, tem sido

reconhecida como causa de uma série de surtos de colite hemorrágica, sendo, portanto, a mais tóxica de todas (12).

As técnicas seletivas para pesquisa da bactéria *E. coli* exploram, principalmente, a tolerância do microrganismo a ácidos biliares e outros compostos tensioativos, o que é consequência do seu habitat natural, o intestino. O primeiro meio seletivo e diferencial foi originalmente concebido por MacConkey, em 1905. Entretanto foi alterado por diversas vezes, mas as suas características essenciais mantiveram-se inalteradas. A sua constituição inclui sais biliares, sais violeta de cristal e, por vezes, anilina, que agem como inibidores de bactérias Gram-positivas. Além disso, o meio inclui a lactose como substrato e um indicador de pH, geralmente o vermelho neutro. Os géneros *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter* produzem colónias vermelhas, pois fermentam a lactose produzindo ácido forte. Já os géneros *Salmonella*, *Proteus* e *Edwardsiella*, com raras exceções, produzem colónias incolores, porque não fermentam lactose. O meio de MacConkey não é, no entanto, fortemente seletivo e irá suportar o crescimento de um número considerável de não Enterobactérias, incluindo bactérias Gram-positivas, tais como os enterococos e os estafilococos (11,12).

Uma característica bioquímica da bactéria *E. coli* que cada vez mais é utilizada nos meios de diagnóstico é a atividade de  $\beta$ -glucuronidase, característica essa que abrange, aproximadamente, 95% das estirpes de *E. coli*. Na identificação da bactéria, também se usam testes bioquímicos, nomeadamente o teste da produção de indol, a partir do triptofano (11,12).

g) Pesquisa de *Salmonella* spp.

O género *Salmonella* é membro da família *Enterobacteriaceae* e caracteriza-se por bactérias Gram-negativas, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas, produtoras de catalase positiva e não produtoras de citocromo oxidado. Este género é dividido em 2 espécies: *S. entérica* e *S. bongori* (10). Dentro da primeira existem 6 subtipos, os quais se encontram no trato gastrointestinal de vários animais, daí que produtos de origem animal e vegetal possam estar contaminados com estes microrganismos. A *S. enteritidis* e a *S. typhimurium* são as mais frequentemente associadas a doenças em humanos (12).

O método amplamente aceite como norma para análise da pesquisa da bactéria consiste na técnica de cultura tradicional, a qual inclui cinco etapas. Este consiste num pré-

enriquecimento em meio não-seletivo, o que aumenta a taxa de recuperação de salmonelas, permitindo a reparação de células, ao mesmo tempo que restringe o crescimento de outros microrganismos presentes (11,12).

São usados vários meios, sendo os mais usados o meio Muller-Kauffman tetracionato, que contém tetracionato, verde brilhante e sais biliares, e o meio Rappaport-Vassiliadis (RV), constituído por cloreto de magnésio e verde malaquite, apresentando uma ligeira redução do pH. Os meios de enriquecimento são utilizados em paralelo, desde que difiram na sua seletividade (11,12). A partir dos meios de enriquecimento seletivo, as culturas são semeadas em meios sólidos, onde se utilizam dois meios em paralelo. Os meios seletivos contêm sais biliares e/ou verde brilhante, como o meio *Xylose Lysine Deoxycholate Agar* (XLD) e o meio *Salmonella Shigella Agar* (SS). Geralmente, a reação de diagnóstico é fornecida pela incapacidade da maioria das *Salmonellas* spp. para fermentar a lactose e/ou produzir sulfureto de hidrogénio. A confirmação é feita através de testes bioquímicos e testes serológicos (aglutinação com anti-soros polivalentes). Todo o protocolo é bastante complexo e demorado, exigindo pelo menos quatro dias para um resultado negativo. Portanto, outros procedimentos têm sido descritos na tentativa de simplificar o processo e reduzir o tempo envolvido, nomeadamente testes que utilizam a motilidade, testes imunológicos *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), sondas de ácido desoxirribonucleico (DNA) que utilizam *Polimerase Chain Reaction* (PCR), entre outros (10).

#### h) Pesquisa e contagem de *Listeria monocytogenes*

A bactéria *L. monocytogenes* é a única estirpe patogénica entre as seis espécies atualmente reconhecidas, dentro do género *Listeria* associada a doenças de origem alimentar. Esta bactéria é um microrganismo intracelular facultativo (pode sobreviver e multiplicar-se em células do sistema de monócitos-macrófagos) e progride com mais facilidade em pessoas imunodeprimidas, dado que ativa a imunidade celular específica dos indivíduos. No entanto, espécies como *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. ivanovii* já foram ocasionalmente associadas a doenças em humanos (16).

A bactéria *L. monocytogenes* é uma bactéria anaeróbia facultativa, Gram-positiva fina com hastes curtas, produtora de catalase, oxidase negativa e não formadora de esporos.

Além disso, produz uma  $\beta$ -hemolisina de 58 kDa, denominada listerolisina O, que atua sinergicamente com a hemolisina produzida por *Staphylococcus aureus*, aumentando a zona de hemólise em agar de sangue. Esta reação constitui o fundamento de um teste de diagnóstico útil para distinguir *L. monocytogenes* da *L. innocua*, o teste de *Christie, Atkins, Munch-Petersen* (CAMP) (10,12).

Os meios mais usados são meios seletivos que contêm cloreto de lítio, feniletanol, anidrido de glicina e antibióticos. A identificação de presumíveis colônias de *Listeria* spp., consiste na incorporação de esculina e citrato de amônio férrico para que as colônias de *L. monocytogenes* formadas apresentem uma cor castanho-escura ou preta, como resultado da sua capacidade de hidrolisar a esculina (12). A confirmação da identificação de *L. monocytogenes* exige mais testes bioquímicos, incluindo testes de fermentação de açúcar, com o objetivo de a distinguir de outras espécies de *Listeria*, em particular, o teste CAMP para diferenciar *L. monocytogenes* de *L. innocua*. Também existem testes miniaturizados específicos que foram produzidos para simplificar este procedimento, como as galerias API e os testes imunológicos (ELISA), que substituem o teste de CAMP (11,12).

i) Contagem de *Bacillus cereus*

Os membros do género *Bacillus* são bactérias Gram-positivas, aeróbias, formadoras de esporos. Este género é constituído por cerca de 80 espécies, mas apenas um pequeno número causa intoxicações alimentares, nomeadamente as espécies *B. cereus* e *Bacillus subtilis* (10).

A espécie *Bacillus cereus* é uma bactéria anaeróbia facultativa, com grandes células vegetativas, tipicamente, com o diâmetro superior ou igual a 0,9  $\mu\text{m}$ . Como formadora de esporos, é amplamente distribuída na natureza e pode ser isolada a partir do solo, da água e da vegetação. Esta ubiquidade significa que é um componente comum da flora intestinal nos humanos. Uma vez que a bactéria é produtora de exotoxinas pode provocar toxinfecções alimentares. (16),9).

Na deteção da bactéria *Bacillus cereus* é comumente usado um meio não seletivo, tal como agar de sangue, utilizando como agente seletivo a adição do antibiótico polimixina, para suprimir as bactérias Gram-negativas. Na identificação da bactéria *Bacillus cereus* é utilizado um meio de diagnóstico mais seletivo que contém polimixina, piruvato, gema de

ovo, manitol e azul de bromotimol. A bactéria produz colónias que retêm a cor azul-turquesa do indicador de pH (azul de bromotimol) devido à sua incapacidade de fermentar o manitol. As colónias apresentam na sua periferia uma zona de precipitação de gema de ovo causada pela atividade da lecitinase (11,12).

j) Pesquisa de esporos de *Clostridium* sulfito-redutores.

O género *Clostridium* é composto por várias espécies, e cada uma destas apresenta um conjunto de fatores de virulência distintos. Os *Clostridium* sulfito-redutores são os que apresentam maior interesse a nível da saúde pública. A análise deste grupo em alimentos ou águas para consumo humano, indica a potencial presença de *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum*.

A bactéria *Clostridium perfringens* é Gram-positiva, anaeróbia, tem a forma de bastonete e forma esporos ovais. Esta espécie de *Clostridium* difere da maioria, que possui grandes hastes, encapsuladas e com motilidade. Embora seja anaeróbia não produtora de catalase, é capaz de sobreviver e crescer, ocasionalmente, na presença de oxigénio. Além disso, apresenta uma distribuição generalizada na natureza, podendo ser isolada a partir de água, sedimentos, poeira e alimentos crus e processados. Consequentemente, esta bactéria é um habitante comum do trato gastrointestinal humano, mas para ocorrer doença é necessário uma ingestão de elevadas quantidades de bactéria, a qual produz a toxina lecitinase (fosfolipase C) (10). Esta toxina possui a capacidade de hidrolisar a lecitina e outros fosfolípidos, desempenhando um papel importante na patogénese através do ataque às membranas das células, o que provoca o rompimento do tecido local da ferida. De realçar que a sua absorção para a circulação provoca uma toxémia grave (10,11).

Na análise a alimentos, a contagem total (células vegetativas mais esporos) é determinada após o aquecimento de uma suspensão a  $80\pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante 10 minutos. Os meios mais utilizados contêm antibióticos como agentes seletivos, fazendo uso da capacidade da bactéria *C. perfringens* reduzir sulfitos para produzir colónias negras. As colónias suspeitas podem ser confirmadas pela ausência de motilidade, pela sua capacidade para reduzir o nitrato a nitrito, pela fermentação de lactose e pela liquefação de gelatina (11,12).

k) Contagem de *Staphylococcus* coagulase positivos

O género *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcaceae* e é constituído por cocos Gram-positivos, com diâmetro de 0,5 a 1,5 µm, imóveis, capsulados e não esporulados. São anaeróbios facultativos, produtores de catalase e de ácidos por degradação da glucose, em aerobiose ou em anaerobiose.

A espécie *Staphylococcus aureus* é a única produtora de coagulase, diferenciando-se das outras espécies patogénicas para o homem. Juntamente com muitos outros estafilococos, está naturalmente presente no nariz, garganta, pele e cabelo dos seres humanos saudáveis, bem como em animais (10,12). O meio de cultura seletivo mais bem sucedido e amplamente utilizado para deteção de *S. aureus* é o meio desenvolvido por *Baird-Parker* (BP), no início de 1960. Este combina as virtudes de um elevado grau de seletividade e a capacidade para recuperar células danificadas. O cloreto de lítio e o telurito atuam como agentes seletivos, enquanto a gema de ovo e o piruvato ajudam na recuperação das células danificadas. A redução do telurito por *S. aureus* produz colónias negras características, que estão rodeadas por uma zona opaca, como ilustrado na figura 2, resultante da hidrólise da vitelina, proteína da gema de ovo. A aparência das colónias no meio BP resulta numa identificação presuntiva de *S. aureus* que é, muitas vezes, confirmada por testes de produção de coagulase. A coagulase é uma enzima extracelular que coagula plasma sanguíneo humano ou animal, na ausência de cálcio, sendo que é usado, normalmente, plasma de coelho tratado com ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA) (11,12).

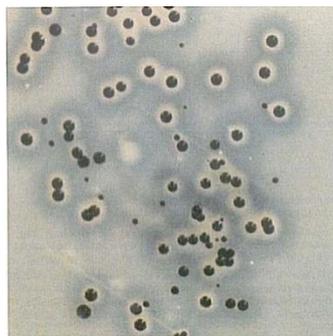


Figura 2- Colónias *Staphylococcus aureus* em meio *Baird-Parker* agar, adaptado da referência (12).

### I.3.2 Principais testes bioquímicos

Apesar de algumas características bioquímicas serem as mesmas para o mesmo género e espécie, existem diferenças exibidas por diferentes estirpes dentro da mesma espécie. A *E. coli* é um exemplo disso, possuindo estirpes que diferem tanto bioquimicamente como antigenicamente. Espécies de géneros diferentes podem mostrar muita similaridade, tal como as bactérias *Salmonella* spp. e *Citrobacter* spp..

Estas variações tornam necessário a utilização de testes bioquímicos para excluir os falsos positivos e negativos. Os meios microbiológicos são muito raramente, ou nunca, seletivamente perfeitos, permitindo o crescimento de outros microrganismos. Em contrapartida, por vezes, os microrganismos de interesse produzem reações atípicas, mas não negativas, o que pode levar a um falso negativo, como por exemplo o género *Salmonella* que, normalmente, não fermenta a lactose. Estes resultados são, geralmente, considerados como prováveis e são necessários testes de confirmação. O uso destes testes permite distinguir o microrganismo de interesse de outros que possuem uma reação semelhante (12).

#### Teste da catalase

O princípio do teste consiste na adição de peróxido de hidrogénio e observação da formação de oxigénio e água. A catalase pertence à subclasse das oxirredutases, as quais utilizam o peróxido de hidrogénio como aceitador e doador de eletrões, decompondo-o em água e oxigénio. A catalase é produzida por bactérias, como o *Bacillus* spp. O resultado é positivo quando a reação de catálise é rápida, libertando oxigénio, fenómeno observado pela formação de bolhas em apenas alguns segundos (11,13).

#### Teste da oxidase

As bactérias que possuem metabolismo respiratório aeróbio possuem o citocromo c na parte final da cadeia respiratória, cujo grupo heme possui um átomo de ferro, o que lhes permite usar o oxigénio livre no seu metabolismo energético, reduzindo-se e oxidando-se. A enzima indofenol oxidase, também presente em microrganismos aeróbios, oxida o citocromo c, sendo este que, na forma oxidada, vai reagir no teste da oxidase. O princípio baseia-se na mudança de cor por oxidação do reagente dihidrocloro de tetrametil *p*-fenilenodiamina, pela enzima do microrganismo oxidase positivo, como por exemplo, a *Pseudomonas*

*aeruginosa*. Esta reação é considerada positiva se, em dez segundos, houver mudança de cor para um composto de cor roxa escuro (11,13).

### Teste para utilização de hidratos de carbono

Muitos microrganismos podem utilizar um ou mais hidratos de carbono no metabolismo energético, processo denominado por fermentação. Esta capacidade pode ser usada para a identificação dos microrganismos. Nos testes de utilização de hidratos de carbono, os microrganismos produzem ácido, normalmente acompanhado pela produção gases. No entanto, algumas bactérias produzem ácido sem a formação de gás, como o género *Listeria*. O teste é comumente utilizado para identificação e discriminação entre espécies e géneros e é também aplicado, após testes preliminares, como coloração Gram, catalase e oxidase, fazendo parte de testes bioquímicos usados como base nas galerias APIs (11,13).

### Teste da coagulase

A coagulase é uma enzima que converte fibrinogénio em fibrina. Neste teste, a enzima reage com fatores plasmáticos, formando um complexo que atua no fibrinogénio do plasma, formando a fibrina. Normalmente, em testes laboratoriais, é usado o plasma de coelho. A produção desta enzima está fortemente associada a estirpes patogénicas de *Staphylococcus aureus* (coagulase positiva). Este teste é comumente utilizado na identificação de *Staphylococcus aureus*, pois, dentro do género *Staphylococcus*, esta é a única espécie patogénica que a produz. Quando o resultado é positivo, o coágulo ocupa mais de metade do volume inicialmente ocupado pelo líquido, como ilustrado na figura 3 (11,13).

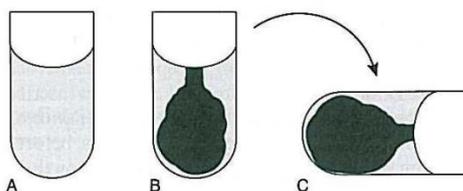


Figura 3- Ilustração da reação do teste de coagulase: A, reação negativa; B e C, forte reação positiva, adaptado da referência (14).

### Teste de aglutinação

O teste de aglutinação mais simples é por deslizamento. Este teste é usado na identificação e divisão de género *Salmonella* em diferente serotipos, baseando-se no

princípio de que as bactérias *Salmonella* spp. possuem uma elevada gama de antígenos de superfície. Utilizam-se anticorpos purificados específicos para um determinado microrganismo. Os anticorpos são misturados com uma colónia isolada do microrganismo em específico. O resultado é positivo quando a aglutinação é vista a olho nu, resultado da ligação do antígeno ao anticorpo (13,14).

### Teste de coloração Gram

É uma técnica que permite, por microscopia, distinguir os dois principais grupos de bactérias, as Gram-negativas e Gram-positivas. Estas distinguem-se pelas suas camadas externas. As bactérias Gram-negativas apresentam uma parede celular mais complexa, constituída por duas camadas de fosfolípidos e por uma fina camada interna de peptidoglicano. Já as bactérias Gram-positivas possuem uma parede celular mais simples, mas robusta, constituída, principalmente, por uma grande camada externa de peptidoglicano e uma interna de lipoproteínas (11,13). Quando as bactérias são tratadas com cristal violeta e depois tratadas com solução de iodo (lugol), forma-se um composto de coloração escura (roxo-violeta), tornando-se visíveis ao microscópio. Tanto as bactérias Gram-negativas como as Gram-positivas são coradas desta maneira. No entanto, nas bactérias Gram-negativas a coloração é reversível, ao contrário das Gram-positivas em que se pode remover o corante com um solvente, normalmente álcool etílico. As bactérias Gram-negativas podem ser recoloradas por um corante de cor contrastante, usualmente vermelho de safranina. Quando observadas por microscopia, as bactérias Gram-negativas apresentam cor vermelha e as Gram-positivas cor roxo-violeta (12).

### O teste de Indol

Este teste determina a capacidade de produção de indol pelo microrganismo. O indol é um composto aromático constituído por um anel benzénico e um pirrol, que faz parte da estrutura do aminoácido triptofano. Algumas bactérias conseguem dividir triptofano e produzir indol. A produção de indol é uma característica possuída por diferentes microrganismos, mas esta é usado principalmente na diferenciação de espécies dentro da

família das *Enterobacteriaceae*, nomeadamente na deteção de *E. coli*. O teste de indol baseia-se na adição do reagente de Kovacs, reagente bioquímico constituído por álcool isoamílico, *p*-dimetilaminobenzaldeído e ácido clorídrico concentrado, o qual reage com o indol, ocorrendo a produção de um complexo de cor vermelha. O resultado considera-se positivo se ocorrer a mudança de cor de amarelo para violeta (11,13).

#### O teste de Christie, Atkins, Munch-Petersen (CAMP)

O teste de CAMP é um teste realizado em meio de agar de sangue, onde a *L. monocytogenes* produz uma  $\beta$ -hemolisina, como referido anteriormente. Esta atua sinergicamente com a hemolisina produzida por *Staphylococcus aureus*, aumentando a zona de hemólise em agar de sangue. O método consiste numa placa de agar de sangue, onde são feitas duas linhas em paralelo, com culturas puras de *Staphylococcus aureus* e *Rodococcus equi*. Depois, perpendicularmente, são feitas linhas horizontais com as estirpes puras de *Listeria* e a bactéria a analisar, sem estas se intersectarem. Posteriormente, é feita incubação a 37°C, durante 18h-24h. Utilizam-se culturas de controlo de *L. monocytogenes*, que apresenta uma banda estreita de  $\beta$ -hemólise, *L. innocua*, não apresentando  $\beta$ -hemólise e *L. ivanovii*, que apresenta uma zona larga de  $\beta$ -hemólise. O resultado é positivo quando a zona de hemólise entre o organismo puro e a cultura a analisar apresentar zonas de  $\beta$ -hemólise idênticas, como ilustrado na figura 4 (11,13).

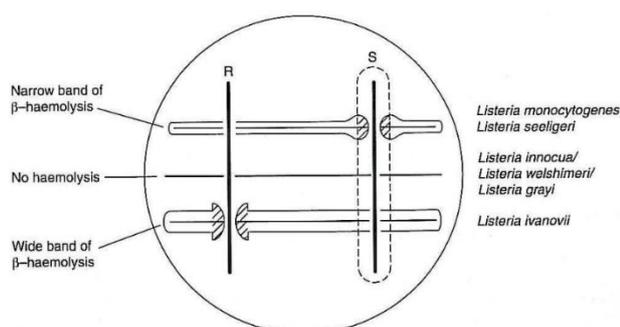


Figura 4- Ilustração da reação dada pela *Listeria* spp. no teste de CAMP, adaptado da referência (14)

#### Galerias Analytical Profile Index (APIs)

Os kits ou galerias APIs compreendem uma gama de testes miniaturizados. A galeria é constituída por um conjunto de cúpulas que contêm o meio de crescimento e reagentes de diagnóstico, para uma elevada variedade de grupos de microrganismos. A galeria mais

conhecida é a API 20 E, que contém mais de 21 testes para identificar os membros da família *Enterobacteriaceae*, como o género *Salmonella*. Outra galeria mais utilizada é a API Listeria, específica para o género *Listeria*.

A figura 5 mostra o resultado das reações quando se usa uma cultura pura de *E. coli*. O microrganismo é identificado consoante a reação positiva ou negativa de cada cúpula, sendo a positividade ou negatividade da reação identificada pela cor que se verifica ou pela formação de precipitados ou pela formação de gás. A partir deste resultado é feita uma identificação do género e espécie do microrganismo, através de uma tabela de resultados, que se encontra no manual de instruções da galeria (11,13).



Figura 5- Galeria API 20E usando uma cultura pura de *E. coli*, adaptado da referência (12).

## I.4 Legislação e sistemas de qualidade e segurança alimentar

### I.4.1 Legislação europeia e nacional

Portugal, como um estado-membro da União Europeia, e conjuntamente com os documentos da Comissão do *Codex Alimentarius*, adota referências e regulamentos realizados pelo Parlamento Europeu e pelo Conselho, implementando-os como legislação obrigatória a seguir por todas as empresas do ramo alimentar (17).

A Comissão do *Codex Alimentarius* (*Codex Alimentarius Commission*), criada em 1963, foi estabelecida por duas organizações: *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) e *World Health Organization* (WHO). Esta comissão tem como principal missão a proteção da saúde do consumidor, assegurando práticas comerciais justas e seguras na área alimentar, bem como promovendo a coordenação de todas as normas alimentares realizadas por organizações internacionais governamentais e não-governamentais. A comissão tornou-se a referência internacional mais importante para o desenvolvimento de normas alimentares. Dentro da legislação alimentar adotada em Portugal, inclui-se como referências base o Regulamento (CE) n.º 178/2002, que institui a

Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA- *European Food Safety Authority*) (17).

A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) localiza-se em Parma, na Itália. Esta foi criada e financiada pela União Europeia como uma agência independente em 2002, após uma série de crises alimentares que levaram o público europeu a expressar preocupações acerca da segurança alimentar e da capacidade das autoridades reguladoras protegerem os consumidores. A EFSA presta aconselhamento científico objetivo em todas as matérias, com uma colaboração estreita com as autoridades nacionais e em consulta aberta com as partes interessadas, tendo um impacto direto ou indireto na segurança alimentar humana e animal (8).

A legislação europeia e, conseqüentemente, nacional encontra-se dividida em três regulamentos. O primeiro, o Regulamento (CE) n.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, refere-se às regras de higiene dos géneros alimentícios a que estão sujeitas as fases de preparação, transformação, fabrico, entre outros, desde a produção primária até à venda ou à disponibilização dos géneros alimentícios ao consumidor, não abrangendo questões relativas à nutrição, nem à qualidade dos géneros alimentícios (17). O segundo regulamento, o Regulamento (CE) n.º 853/2004, contém as regras específicas de higiene aplicáveis aos alimentos de origem animal, a fim de garantir um nível elevado de segurança dos géneros alimentícios e de saúde pública. O terceiro regulamento, o Regulamento (CE) n.º 854/2004, consiste no estabelecimento de um quadro comunitário para controlo de produtos de origem animal destinados ao consumo humano. Este regulamento estabelece regras específicas para as carnes frescas, os moluscos bivalves, o leite e os produtos láteos (17).

Estes Regulamentos são ainda complementados pelo Regulamento (CE) n.º 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, relativo aos controlos oficiais realizados para assegurar a verificação do cumprimento da legislação relativa aos alimentos para animais e aos géneros alimentícios, normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais. A Diretiva 2002/99/CE estabelece as condições para a colocação no mercado dos produtos de origem animal, restrições aplicáveis aos produtos provenientes de países ou de regiões terceiros, sujeitos a restrições de polícia sanitária. A implementação de um sistema *Hazard Analysis and Critical Control Point* (HACCP) nas empresas alimentares encontra-se incluído no Regulamento (CE) n.º 852/2004. Torna-se necessário a

obrigatoriedade do seguimento de um processo ou processos permanentes baseados nos princípios HACCP, por parte de todas as empresas do ramo alimentar (17).

#### **I.4.2 Sistemas de qualidade e segurança alimentar**

Os sistemas de qualidade e segurança alimentar constituem uma abordagem sistemática para garantir a qualidade e segurança dos produtos alimentares, em qualquer estágio de produção e distribuição. Alguns dos sistemas são obrigatórios por lei e outros são implementados voluntariamente. Os sistemas obrigatórios consistem nos Regulamentos (CE) n.º 852, 853, 854 de 2004, onde o plano HACCP, bem como os seus pré-requisitos, se encontram incluídos. Já os sistemas voluntários consistem em normas que surgem na forma de códigos de prática, diretrizes gerais e outras recomendações (17). As normas internacionais são usadas com o intuito de se alcançar a uniformidade, a promoção da normalização, bem como atividades relacionadas com a concretização destes objetivos. Dentro das normas internacionais incluem-se as *International Organization for Standardization* (ISO) 9001:2008 e ISO 22000:2005, bem como normas específicas para retalho em certos países, como *International Featured Standards* (IFS) e *British Retail Consortium* (BRC) (18).

##### **I.4.2.1 Pré-requisitos para implementação de sistemas de qualidade alimentar**

Antigamente, a produção de alimentos orientava-se pelas Boas Práticas de Fabrico (GMP – *Good Manufacturing Practice*), pelas Boas Práticas de Higiene (GHP – *Good Hygiene Practices*) e pela análise de produtos finais. Estes procedimentos garantiam a obtenção de um produto final estável e seguro. No entanto, a disseminação dos perigos biológicos começou a gerar casos de grande gravidade e risco para a saúde dos consumidores. Como tal, foi necessário implementar sistemas que tenham uma prevenção ao longo dos processos e não somente a nível do produto final, como é o caso do HACCP (17).

A aplicação e seguimento do programa de pré-requisitos é de extrema importância, pois a maioria dos casos detetados não conformes não estão relacionados com as falhas na implementação do HACCP, mas sim no cumprimento de boas práticas de higiene. Os pré-requisitos garantem as condições operacionais e ambientais básicas necessárias para a

produção de alimentos inócuos. Os códigos de boas práticas que estão incluídos no *Codex Alimentarius*, conjunto de documentos de natureza diversa, agrupados em normas e disposições, funcionam como programas de pré-requisitos para a implementação de um sistema HACCP (19).

Assim, o sistema HACCP deve ser implementado sobre uma base sólida de cumprimento de pré-requisitos, tais como, os incluídos no campo de ação das Boas Práticas de Fabrico, nos Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (SSOP – *Sanitation Standard Operating Procedures*) e nas Boas Práticas de Higiene. Como se verifica na figura 6, as GMP, os SSOP e GHP cobrem muitos aspetos operacionais de instalações e pessoal (17). Os pré-requisitos têm um papel essencial, uma vez que são obrigatórios por lei no controlo da segurança alimentar, constituindo ferramentas de garantia de um produto final seguro. Geralmente, os pré-requisitos devem controlar os perigos associados com a localização e estruturas, serviços, pessoal, instalações e equipamentos, enquanto o plano HACCP deverá controlar perigos associados diretamente com o processo (19).



Figura 6- Áreas abrangentes dos pré-requisitos, adaptado da referência (19).

#### **I.4.2.2 Plano “*Hazard Analysis and Critical Control Point*” (HACCP)**

O sistema de HCCP, sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo, é um sistema preventivo de controlo da segurança alimentar que começou por ser aplicado pela Agência Espacial Norte Americana (NASA), nos anos 60. Este sistema apareceu devido ao facto de as intoxicações alimentares poderem comprometer e afetar os astronautas, bem

como a realização da sua missão espacial. O Sistema de HACCP foi criado pela *Pillsbury Company*, em conjunto com a NASA, com o intuito de desenvolverem processos de produção de alimentos seguros para o exército Norte-americano, para o programa espacial. Em 1971, o Sistema HACCP foi apresentado pela primeira vez, numa conferência sobre segurança alimentar, onde foi publicado em 1973, o primeiro documento que detalha esta técnica (15,17).

Este sistema foi depois adotado pela *Food and Drugs Administration (FDA)*, órgão do governo dos Estados Unidos, criado em 1862, com a função de proteger a saúde pública, assegurando a eficácia e segurança dos medicamentos de uso humano e veterinário, produtos biológicos, dispositivos médicos, alimentos, cosméticos e produtos que emitem radiação. O plano HACCP foi aplicado pela FDA no desenvolvimento de normas legais para a produção de alimentos de baixa acidez, porque estes eram mais propícios a contaminação microbiana. Em 1985, o sistema foi indicado pela Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos para programas de segurança alimentar. Em 1988, a *International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF)* sugeriu a sua utilização como base para o controlo de qualidade, do ponto de vista higiénico e microbiológico (19). A Comissão do *Codex Alimentarius* incorporou as diretrizes para aplicação deste sistema, na sua vigésima reunião em Genebra, de 28 de Junho a 7 de Julho de 1993. Nesse ano, a União Europeia integrou as normas gerais aplicadas aos géneros alimentícios, integrando os princípios do Sistema HACCP a 14 de Junho de 1993, sendo que essa norma foi substituída pelo Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004 (15,17).

#### **I.4.2.2.1 Os princípios do HACCP**

A implementação do sistema HACCP possibilita o aumento da segurança e confiança do consumidor, facilitando o cumprimento de exigências legais e permitindo uma resposta mais rápida e eficiente relacionada com a inocuidade dos alimentos (19). A sua implementação segue normalmente uma metodologia que se baseia em 7 princípios fundamentais:

### Princípio 1 -Análise de perigos

Este consiste na realização de uma análise de perigos, onde se identificam os potenciais perigos associados a todas as fases do processo, desde a matéria-prima até ao consumidor final. Inerente ao processo, encontra-se a avaliação da probabilidade e severidade da ocorrência do perigo identificado, bem como a análise de eventuais medidas preventivas, determinando a sua significância (19). Como já foi abordado no capítulo I, existem 3 tipos de perigos alimentares: os microbiológicos, os químicos e os físicos. A sua identificação é essencial na implementação do sistema HACCP.

### Princípio 2 – Determinação dos pontos críticos de controlo (PCC)

A determinação dos PCC consiste num local, passo ou procedimento onde se espera que se efetue o controlo de um perigo. A determinação dos PCC é utilizada para eliminar ou minimizar o perigo e a probabilidade da sua ocorrência. Na figura 7 encontra-se uma árvore de decisão para PCC, a qual identificar 3 condições: se este ponto do processo representa um ponto crítico, se este necessita ou não de controlo e se já é controlado pelos pré-requisitos (5,18).

### Princípio 3- Estabelecimento de limites críticos

O estabelecimento dos limites críticos deve garantir que cada PCC seja controlado, sendo que, o limite crítico consiste no critério ou valor que define a aceitação ou não do processo. Por exemplo, as bactérias *Salmonella* spp. não são permitidas, por lei, nos alimentos (5,17).

### Princípio 4- Estabelecimento de um sistema de monitorização

O estabelecimento de um sistema de monitorização permite verificar se um ponto de controlo se encontra sob controlo, produzindo registos precisos para uso futuro na verificação do sistema. Este pode ser feito com o recurso a análises microbiológicas periódicas (4).

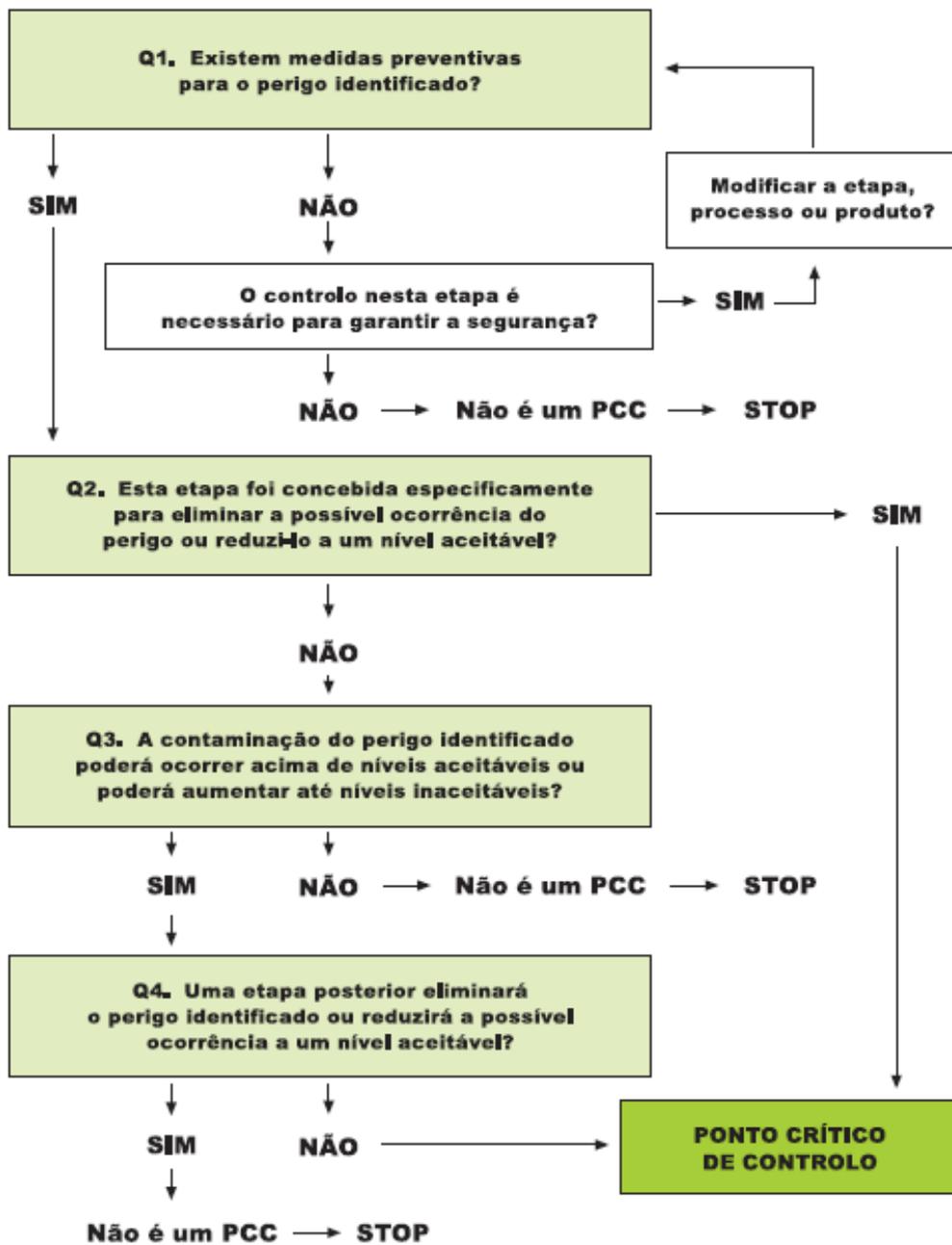


Figura 7 -Árvore de decisão de PCC, adaptado da referência (4).

### Princípio 5- Estabelecimento de ações corretivas

Estas ações são as medidas aplicadas em resposta a desvios aos limites críticos, ou seja, medidas corretivas a tomar se o PCC se desviar dos valores aceitáveis (5,17).

#### Princípio 6- Estabelecimento de procedimentos de verificação

O estabelecimento de procedimentos de verificação comprova a eficácia do sistema HACCP, ou seja, consiste na aplicação de métodos, testes ou procedimentos que confirmem a eficácia e cumprimento deste plano (19).

#### Princípio 7- Estabelecimento de documentação e registos

O estabelecimento de documentação e registos, referentes aos princípios e à sua aplicação, consiste na produção de registos precisos para uso futuro na verificação do sistema (5,17).

#### **I.4.2.2.2 Análises microbiológicas no sistema HACCP**

A implementação com sucesso do sistema HACCP requer o uso de análises e recolhas microbiológicas, as quais são importantes na avaliação das condições de higiene dos manipuladores, superfícies e utensílios a que o alimento possa entrar em contacto. Estas análises são importantes em quatro dos princípios do plano HACCP: na análise de perigos, na determinação de pontos críticos de controlo, no estabelecimento de limites críticos e no estabelecimento de procedimentos de verificação (12).

Para cada tipo de indústria alimentar deve ser estabelecido um plano de amostragem microbiológica. Este plano deve adequar-se à natureza dos alimentos, bem como aos processos pelos quais estes são expostos, tendo em conta o nível que esse risco apresenta. Esta é uma atividade de verificação essencial, permitindo a validação, isto é, a obtenção de evidências de que os vários princípios do plano HACCP são efetivos (15).

Os principais microrganismos analisados são aqueles que indicam a possibilidade de intoxicação alimentar e a presença e de outras bactérias patogénicas, os quais se denominam microrganismos “indicadores”, como as bactérias Coliformes, a família das *Enterobacteriaceae* e os principais microrganismos patogénicos que já foram abordados no capítulo I, uma vez que era impraticável fazer-se uma análise de todos os microrganismos patogénicos (12).

### **I.4.2.3 Normas Internacionais**

Para além dos pré-requisitos e do HACCP, em conjunto com a legislação europeia, existem normas que são de carácter facultativo, como a norma ISO 9001:2008, que especifica requisitos para um sistema de gestão da qualidade, onde uma organização precisa de mostrar a sua capacidade para fornecer de forma consistente produtos que atendam ao cliente. Esta norma não é específica para a indústria alimentar. A norma ISO 22000:2005 especifica requisitos para um sistema de gestão de segurança alimentar e existe a necessidade de uma organização demonstrar a sua capacidade para controlar os perigos de segurança alimentar, com a finalidade de garantir que o alimento é seguro no momento do consumo humano (20). As normas ISO são usadas com o intuito de se alcançar a uniformidade e de se promover a normalização de atividades relacionadas com a concretização destes objetivos (18). As disposições surgem na forma de códigos de prática, diretrizes gerais e outras recomendações, não sendo, por isso, aplicáveis (17).

Existem outras normas, como a IFS, que consistem em certificações exigidas por clientes que se focam no retalho. Em países como a Alemanha e França, estas focam-se na avaliação do sistema da qualidade e de segurança alimentar de fornecedores. A certificação da IFS é feita por uma avaliação de requisitos, baseada num sistema de pontuações. A BRC é uma certificação exigida pelos clientes, no retalho para a Inglaterra (19,20).

## **I.5 Higienização e contaminação em pequenas indústrias alimentares**

### **I.5.1 Higiene em pequenas indústrias alimentares**

Na indústria alimentar, o processo de higienização constitui um conjunto de práticas que forneçam boas condições iniciais de higiene em superfícies, equipamentos, utensílios e todo o tipo de material que entra em contacto com o alimento. A higienização deve remover os materiais indesejados (restos de alimentos, corpos estranhos, resíduos de produtos químicos e microrganismos) das superfícies para um nível que não apresente qualquer risco para a qualidade e segurança do produto. A higienização é feita pela simples limpeza ou pela limpeza seguida de desinfecção. O processo de limpeza consiste basicamente na eliminação de restos de alimentos e outras partículas que permanecem sobre as superfícies e é feita através da utilização de detergentes com agentes alcalinos ou ácidos. A eficiência destes detergentes depende da concentração, temperatura, tempo e ação mecânica (23).

Já a desinfecção consiste na destruição ou remoção dos microrganismos ou na redução para níveis aceitáveis de microrganismos que sobrevivem à limpeza física (10). A desinfecção encontra-se dividida em 3 tipos: desinfecção por calor, desinfecção por radiação e desinfecção química. A desinfecção por intermédio do calor é um bom método, pois não é corrosivo e destrói todos os tipos de microrganismos, embora apresente as limitações de não poder ser utilizada em superfícies sensíveis ao calor e de ser relativamente cara. Este tipo de desinfecção é eficaz, caso se assegure que a temperatura atinge toda a superfície a desinfetar e durante o tempo necessário para a destruição dos microrganismos (apresenta bons resultados em circuitos fechados). A desinfecção por radiação consiste na absorção da radiação pelos restos de alimentos e outras sujidades. Este processo é mais usado em hospitais e laboratórios e não tanto na indústria alimentar. Nesta, a desinfecção química é a mais utilizada. Os desinfetantes não são universais, pelo que na prática é preciso algum cuidado na escolha e aplicação dos desinfetantes. Dos desinfetantes mais usuais destacam-se os desinfetantes à base de cloro e compostos de cloro, os quais são mais baratos, bem como os desinfetantes à base de compostos de iodo e os desinfetantes à base de compostos de amónio quaternário (9,22).

Na análise da higienização, utilizam-se zaragoas estéreis, que permitem capturar detritos e microrganismos de uma área específica para posterior examinação na deteção de microrganismos específicos. As zaragoas são usadas para avaliar o estado de higienização, tanto dos manipuladores como superfícies e normalmente são esfregadas a uma área de 100 cm<sup>2</sup>. Para a avaliação da higienização, retiram-se também amostras físicas e líquidas de várias superfícies ou materiais (12).

### **1.5.1.1 Higiene pessoal**

A higiene pessoal consiste no estado geral de limpeza do corpo e roupas dos manipuladores de alimentos. Como tal, a Comissão do *Codex Alimentarius* estabeleceu o “Código de Práticas Internacionais Recomendadas de Princípios Gerais de Higiene Alimentar”, que apresenta os requisitos básicos de higiene e de comportamento relacionados com a produção de produtos alimentares, já referido anteriormente (24). Os principais microrganismos, nomeadamente bactérias, vírus, entre outros, são suscetíveis de estar presentes no corpo e roupas das pessoas, podendo passar para os alimentos e, conseqüentemente, causar doença, tais como *Staphylococcus aureus*, *Listeria* spp.,

*Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., *Salmonella typhi*, *Vírus da hepatite*, *Shigella* spp.. Estes microrganismos estão presentes nas roupas dos manipuladores, cabelo, garganta, nariz, entre outros, podendo passar para os alimentos, onde se desenvolvem. A higiene das mãos é, por este facto, muito importante, uma vez que estas são o principal meio de transmissão de contaminação para os alimentos. As mãos, ao entrarem em contacto com o ar, com os utensílios, com partes do corpo que estejam sujas, podem muito facilmente contaminar o produto alimentar. A lavagem das mãos é, portanto, de extrema importância, daí ser necessária a sua correta e frequente lavagem (24).

### **I.5.1.2 Higiene dos espaços e utensílios**

A limpeza e desinfecção de superfícies e utensílios podem evitar a contaminação cruzada, uma vez que promovem a remoção física dos resíduos de alimentos, levando à inativação química dos microrganismos. Esta contaminação é, maioritariamente, associada à água de lavagem, esponjas contaminadas ou outros utensílios contaminados colocados em contato com os alimentos (25). Vários estudos já descobriram que os panos e esponjas podem ser disseminadores importantes de microrganismos patogénicos, levando à contaminação cruzada dos alimentos. Os materiais mais utilizados em superfícies que entram em contato com alimentos, em indústrias e cozinhas, são de aço inoxidável e polietileno. No entanto, as superfícies desses materiais são irregulares quando observadas ao microscópio, facilitando, assim, a deposição de matéria orgânica e resíduos de alimentos. Deste modo, criam-se condições propícias à adesão e sobrevivência de microrganismos (25). De acordo com Kusumaningrum *et al*, bactérias que foram transferidas a partir de esponjas para superfícies podem sobreviver durante horas em superfícies de aço inoxidável (26).

## Capítulo II. Parte Experimental

### II.1 Serviços efetuados no Laboratório YourLab S.A.

No laboratório YourLab S.A. são feitas várias análises, divididas em três categorias: análises a alimentos, análises a águas e análises a zaragatoas (tanto de manipuladores como de superfícies). O laboratório tem, principalmente, dois grandes clientes: uma empresa de comércio de carnes e uma empresa de segurança no trabalho e higiene alimentar. Esta empresa subcontrata o laboratório para recolher e analisar amostras das várias empresas de restauração em que esta implementou e verifica o plano HACCP.

Na empresa realiza-se, mensalmente, análise à carne picada a 23 talhos. Os parâmetros analisados são a contagem da bactéria *E. coli* a 5 amostras de carne por talho, conforme estabelecido pela portaria 699/2008 de 29 de Julho, e a análise a zaragatoas (para avaliar a higienização), onde se analisa uma zaragatoa de superfície e uma de manipulador. Na análise de ambos os tipos de zaragatoas, os parâmetros analisados são a contagem de Enterobactérias e Microrganismos a 30°C.

Na empresa de segurança no trabalho e higiene alimentar, o laboratório faz análises conforme a implementação do Plano HACCP das diferentes empresas de restauração, onde são recolhidas amostras de produtos, zaragatoas e águas. Neste caso, o laboratório faz o planeamento e a recolha das amostras aos vários locais. Estas empresas são constituídas por vários tipos de estabelecimentos com ou sem fabrico próprio, tais como hotéis, restaurantes, cantinas municipais, Instituições Particulares de Solidariedade Social (IPSSs), padarias, pastelarias, queijarias, Snack bares, talhos, frutarias, minimercados, indústria de congelados, bares de escolas, peixarias, entre outros. O laboratório realiza também análises a clientes esporádicos, os quais se dirigem ao laboratório diretamente com o produto ou contactam o laboratório, que posteriormente faz a recolha, transporte e análise das amostras. Para além das análises de águas, alimentos e zaragatoas em empresas de restauração e talhos, o laboratório realiza também análises de avaliação do tempo de prateleira de produtos e análises microbiológicas de qualidade de processos.

## II.2 Controlo de qualidade dos ensaios microbiológicos.

### II.2.1 Controlo de qualidade interno e externo

Para que o laboratório possa avaliar constantemente o seu trabalho e os seus resultados, possui um controlo de qualidade interno e externo. O controlo de qualidade interno tem como principal objetivo assegurar a conformidade dos critérios definidos nas normas padrão respetivas para cada ensaio, bem como assegurar a consistência de resultados realizados no dia-a-dia. O controlo de qualidade externo é feito de modo a avaliar as competências através da realização de ensaios laboratoriais.

O controlo de qualidade interno e externo são determinados na norma ISO 7218:2007 “*Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations*”. Segundo esta norma, é necessário demonstrar que a variabilidade (entre analistas, entre equipamentos ou entre materiais) está sob controlo através de um programa de verificações periódicas. Os vários parâmetros internos e externos encontram-se na tabela 5, assim como a frequência e o objetivo de cada medida executada para o controlo de qualidade.

Tabela 5 – Processos internos e externos de controlo de qualidade realizados no laboratório YourLab S.A.

		Controlo	Frequência	Objetivo
Interno	Água desionizada	Condutividade	Mensalmente	Qualidade do meio
		Micro a 22°C		
	Meios de cultura	pH	A cada lote	
		Aspeto físico	A cada lote	
		Taxa de recuperação	A cada lote	
		Controlo positivo e negativo	A cada lote	
	Análise	Branco	1 por cada série de ensaios	Avaliar esterilidade
		Lenticulas	20 análises por carta, as restantes mensalmente	Cartas guias
		Duplicados	1 por cada série de ensaios	Cálculo da incerteza
		Controlo positivo e negativo	1 por cada série de confirmações	Capacidade de confirmação
Externo	Ensaio interlaboratoriais	Água: 2/ano Alimentos: 3/ano	Avaliar técnicos e metodologias	

## **II.2.2 Controlo ambiental**

Segundo a norma ISO 7218:2007 “*Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations*”, é necessário fazer um controlo ambiental, mensalmente, realizado a todas as áreas de trabalho, bem como a todos os equipamentos do laboratório. Este controlo garante que as condições ambientais do laboratório são as ideais, ou seja, que a higienização de todas as salas e equipamentos é bem executada. Para este controlo são efetuados ensaios de enumeração de microrganismos a 30°C por cm<sup>2</sup>, em cada área de trabalho, através da análise de zaragatoas. Também são realizadas análises de enumeração de microrganismos a 30°C no ar e enumeração de bolores e leveduras em cada uma das áreas e equipamentos a avaliar: “sala de preparação de amostras”, “sala de preparação de meios”, “sala de descontaminação”, “zona de filtração”, “zona de análise” e “zona de leitura e confirmação”, em cada uma das quatro estufas e câmara de fluxo laminar. O meio PCA é utilizado para a enumeração dos microrganismos a 30°C e o meio DRBC para a enumeração de bolores e leveduras. As placas ficam expostas durante 15 minutos e, de seguida, são incubadas à temperatura e tempo adequados a cada análise.

## **II.3 Avaliação das amostras analisadas no decorrer do estágio**

### **II.3.1 Análise de Alimentos**

#### **II.3.1.1 Tipos de amostras e estabelecimentos**

Os alimentos analisados variam de alimentos prontos a consumir a produtos não confeccionados. Os produtos prontos a consumir consistem em refeições mistas, petiscos, produtos de padaria e pastelaria. Já os produtos frescos consistem em carnes cruas, massa de pão, enchidos, peixe, rissóis, croquetes, entre outros. Os estabelecimentos são os mesmos referidos anteriormente no ponto II.1.

#### **II.3.1.2 Recolha**

Os alimentos são recolhidos em sacos estéreis e mantidos numa mala térmica com termoacumuladores até à chegada ao laboratório, onde são colocados num frigorífico. A temperatura deve ser mantida entre 0 a 4°C e a amostra deve ser analisada dentro de 24h. No

decorrer do estágio, de 17/09/2013 a 23/06/2014, realizaram-se 204 análises a microrganismos a 30°C, 13 contagens de Enterobactérias, 49 análises a bactérias coliformes, 1778 contagens de *E. coli* β-glucuronidase positiva, 103 contagens de Estafilococos coagulase positiva, 161 pesquisas da bactéria *Salmonella* spp., 66 análises de pesquisa de esporos de *Clostridium* sulfito-redutores e, por fim, 47 análises de pesquisa e 46 contagens da bactéria *Listeria monocytogenes*.

### II.3.1.3 Preparação dos alimentos

No caso dos alimentos, é necessário um tratamento prévio, de modo a que as placas não fiquem saturadas e que cada meio/diluyente seja usado conforme o tipo de análise a efetuar. Na figura 8, encontra-se descrito o procedimento da preparação das amostras de alimentos. A preparação consiste em efetuar uma diluição de  $10^{-1}$  que corresponde à solução mãe, sendo as proporções de alimento/diluyente de 1:9.

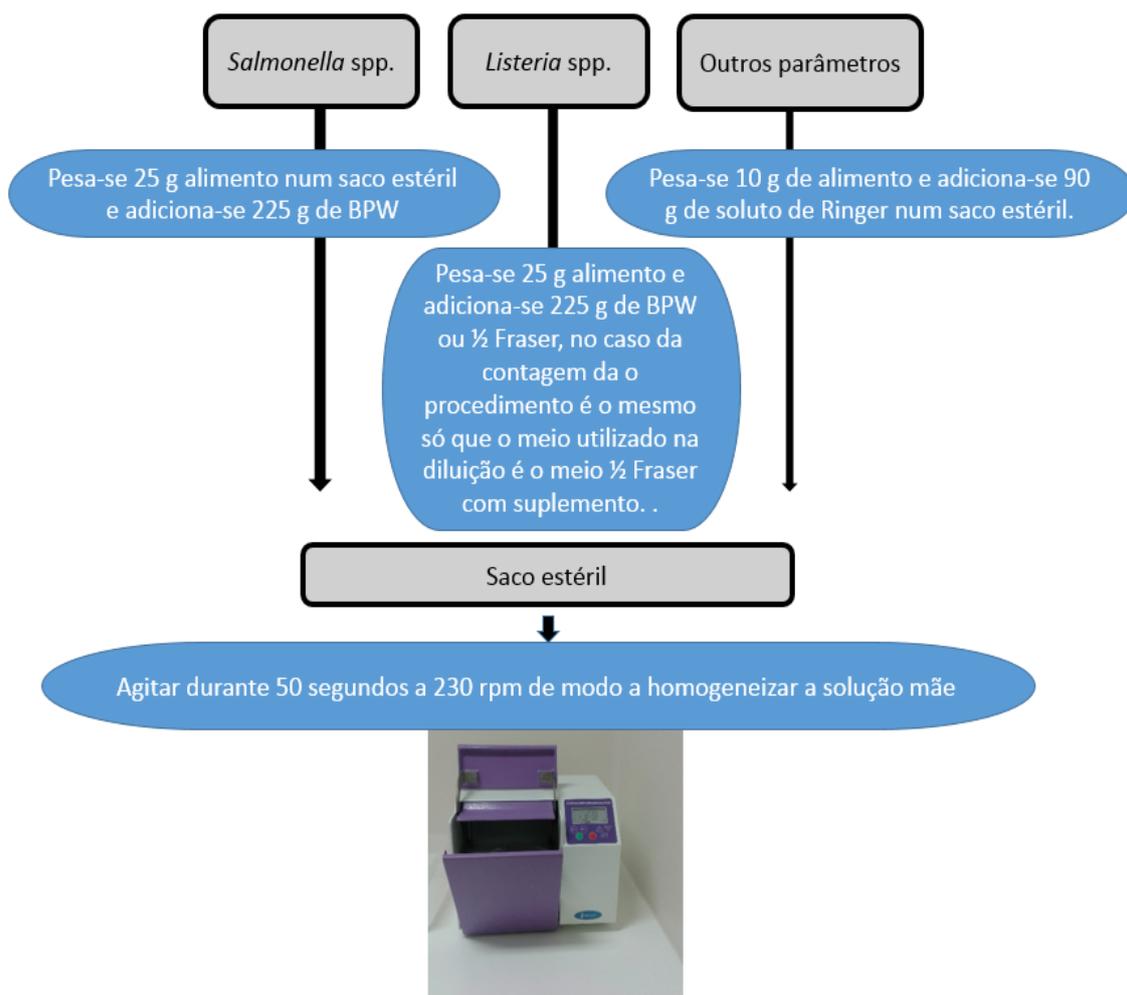


Figura 8- Esquema representativo da preparação das amostras para os diversos parâmetros.

Utiliza-se o Sóluto de Ringer nos vários parâmetros de bancada, à exceção da pesquisa e contagem de *Listeria monocytogenes* e pesquisa da bactéria *Salmonella* spp.. No caso dos vários parâmetros de bancada, pesa-se 10 g de alimento e adiciona-se 90 g de soluto de Ringer num saco estéril.

No caso da pesquisa da bactéria *Salmonella* spp. pesam-se 25 g de alimento num saco estéril e adiciona-se 225 g de BPW (*Buffered Peptone Water*). Na contagem da bactéria *Listeria*, é utilizado, tanto o meio de cultura ½ Fraser como BPW, pesando-se 25 g de alimento e diluindo-se num fator de diluição de 1:10. No caso da pesquisa da *Listeria monocytogenes*, o procedimento é o mesmo, mas o meio utilizado na diluição é o meio ½ Fraser com suplemento. O procedimento está exemplificado em esquema na figura 9.

Em cada um dos ensaios de enumeração de microrganismos devem ser efetuadas diferentes diluições da solução-mãe da amostra, de forma a garantir a obtenção de um número de colónias calculáveis nas placas após incubação, para que esteja de acordo com os princípios de qualidade dos métodos descritos na norma ISO 7218:2007 “*Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations*”.

#### **II.3.1.4 Procedimento das análises efetuadas**

##### **Métodos de Pesquisa de microrganismos em alimentos**

Os métodos de pesquisa constituem métodos creditados para a deteção da presença ou ausência de microrganismos num determinado volume ou massa. Os microrganismos pesquisados no laboratório são a bactéria *Salmonella* spp., a bactéria *Listeria monocytogenes* e a pesquisa de esporos das bactérias *Clostridium* sulfito-redutoras. O procedimento usado para cada uma destas são baseados nas normas padrão ISO 6579:2002 “*Horizontal method for the detection of Salmonella spp.*”, ISO 11290-1 “*Horizontal Method for the detection of Listeria monocytogenes*” e NP 2262:1986 “*Regras gerais para a pesquisa de esporos da bactéria Clostridium sulfito-redutores*”, respetivamente.

## Pesquisa de *Salmonella* spp.

A pesquisa de bactérias *Salmonella* spp. é realizada segundo a norma padrão ISO 6579:2002 “*Horizontal method for the detection of Salmonella spp.*”. Esta norma é relativa à metodologia tradicional baseada no método de 5 etapas, o qual constitui um procedimento moroso, que no caso de confirmação pode demorar 3 a 5 dias. O resultado desta análise pode ser “ausente em 25g” ou “presente em 25g”. O procedimento encontra-se sinteticamente descrito, na figura 9.

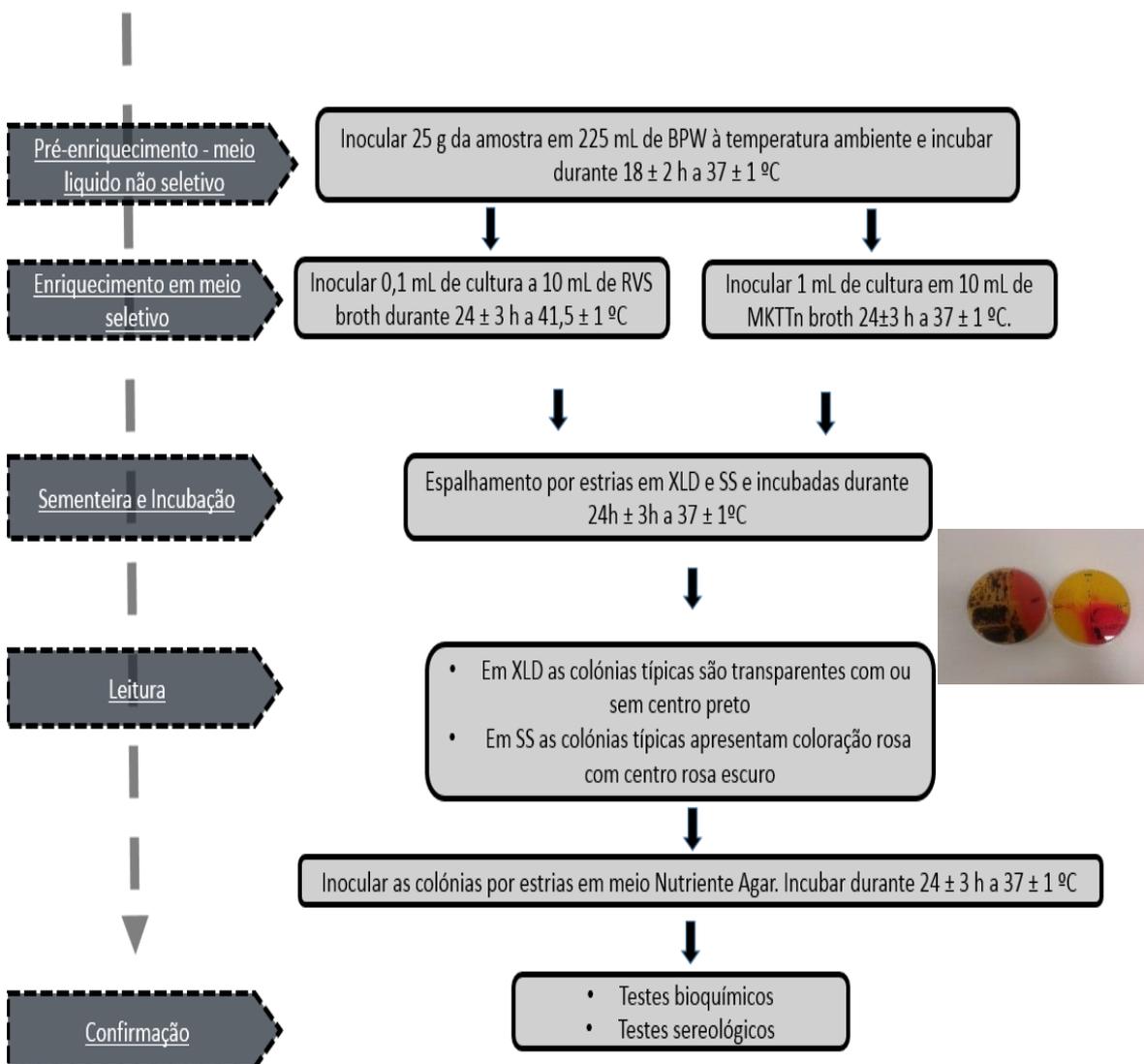


Figura 9- Esquema em síntese do método de pesquisa de *Salmonella* spp., segundo a norma de referência ISO 6579:2002; designando-se BPW, *Buffered Peptone Water*; RV broth, *Rappaport-Vassiliadis broth*; MKTTn, *Mueller Kauffmann Tetrathionate Novobiocin Broth*; XLD agar, *Xylose lysine deoxycholate*; SS agar, *Salmonella e Shigella Agar*.

## Pesquisa da bactéria *Listeria monocytogenes*

O método de pesquisa da *Listeria monocytogenes* baseia-se num pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo da amostra. De seguida, a solução obtida, após os enriquecimentos, é plaqueada por espalhamento, em meio *Oxford agar* e em ALOA (*Agar Listeria Ottavani & Agosti*). A confirmação da presença de colónias características da bactéria *Listeria monocytogenes* é feita através de testes bioquímicos: reação da catalase, coloração Gram teste de hemólise e, por fim, API Listeria. Os resultados são apresentados como “ausente em 25g” ou “presente em 25g”. O procedimento encontra-se descrito, em síntese, na figura 10. A “parte 2” da norma padrão ISO 11290:1996 diz respeito ao ensaio de enumeração desta bactéria em alimentos.

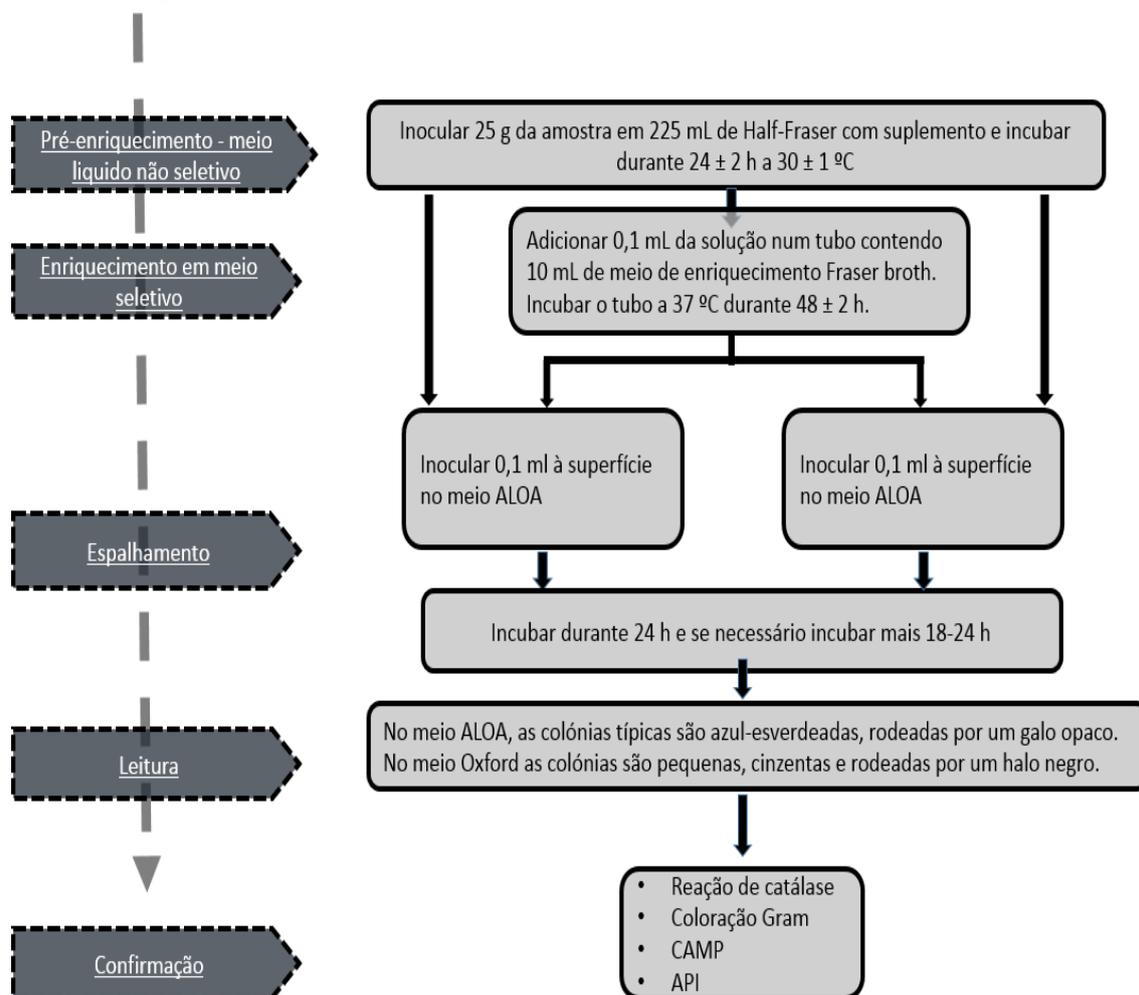


Figura 10– Esquema em síntese da pesquisa de *Listeria monocytogenes* segundo o procedimento padrão descrito na norma ISO 11290-1:1996 “Horizontal Method for the detection of *Listeria monocytogenes*”. Sendo ALOA, *Agar Listeria Ottavani & Agosti*.

## Pesquisa de esporos de *Clostridium* sulfito-redutores

O método de pesquisa de esporos de *Clostridium* sulfito-redutores consiste, primeiramente, numa inativação por calor, seguida de um arrefecimento rápido, de forma a eliminar as células vegetativas e a ativar os eventuais esporos existentes. De seguida, a amostra é inoculada no meio *Meat Yeast Agar* e incubada a 37°C, durante 1 a 5 dias, sendo o resultado positivo caracterizado pelo enegrecimento do meio. O procedimento encontra-se descrito na figura 11. Os resultados são expressos como positivo ou negativo em 10<sup>d1</sup>g e/ou em 10<sup>d2</sup>g, em que d1 significa o expoente da mais alta diluição decimal positiva e d2 representa o expoente da mais baixa diluição decimal negativa. A análise é feita segundo a norma NP 2262:1986 “Regras gerais para a pesquisa de esporos de Clostrídios sulfito-redutores”.

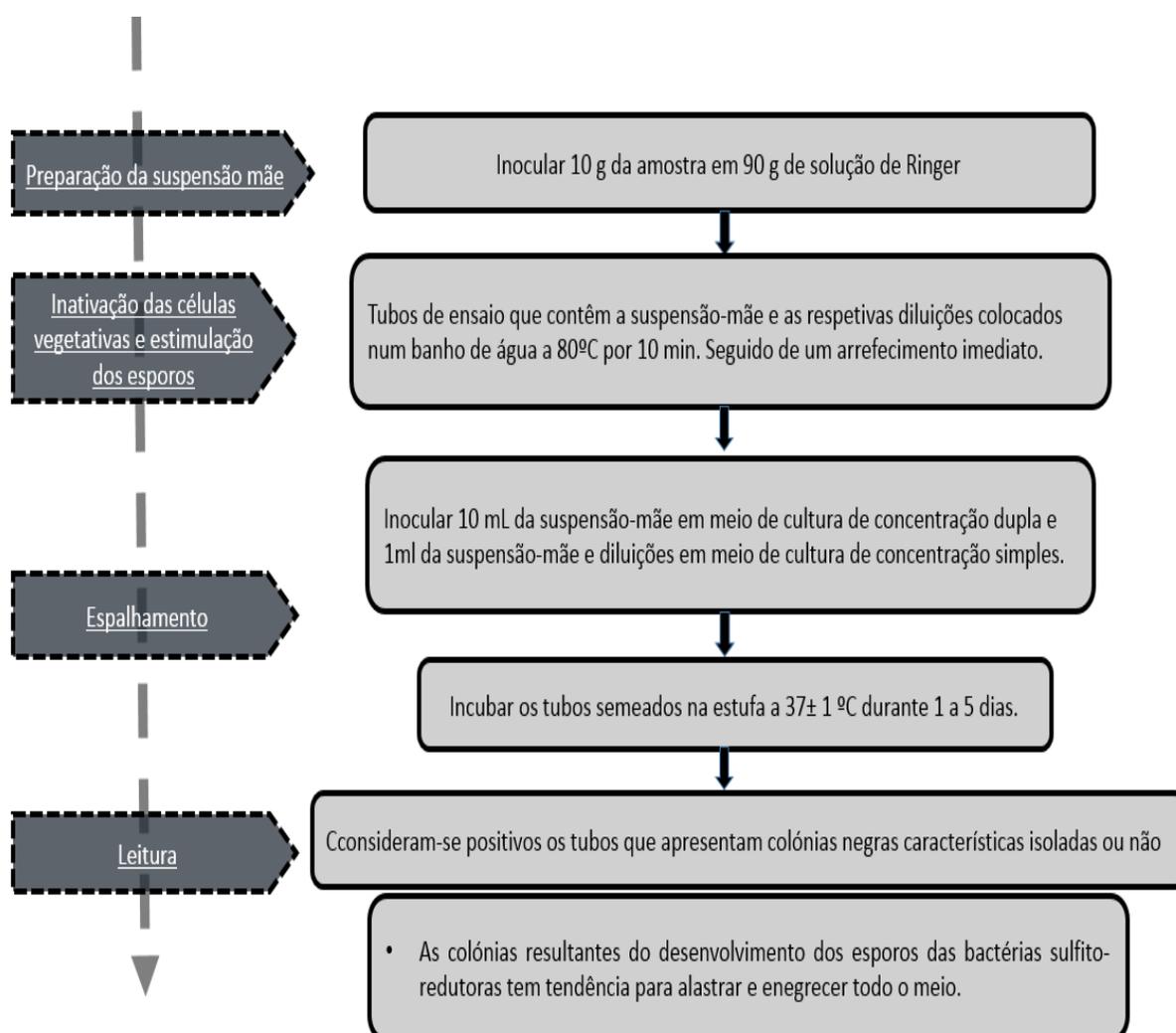


Figura 11– Esquema de procedimentos de método padrão para pesquisa de esporos de *Clostridium* sulfito-redutores, segundo a norma NP 2262:1986.

## Métodos gerais de contagem de microrganismos

Os métodos de contagem consistem na contagem de colónias formadas após incubação da solução-mãe e diluições num meio específico para o crescimento do microrganismo em causa. Alguns meios são gerais, como o "Plate Count Agar"(PCA), utilizado na análise de microrganismos mesófilos totais ou microrganismos a 30°C. Outros meios são cromogéneos, como o TBX, utilizado na análise de *E. coli*  $\beta$ -glucuronidase positiva, onde o crescimento do microrganismo é visível pela cor das colónias, resultado de degradação de um substrato específico. Outros meios, como o BP "Baird Parker" necessitam de testes bioquímicos posteriores, como é o caso dos Estafilococos coagulase positivos. Na tabela 6, estão descritos, resumidamente, os métodos de análises dos diferentes microrganismos, conforme a norma padrão.

Tabela 6 – Resumo dos métodos de contagem de microrganismos em alimentos: princípio do método, meio de cultura utilizada, condições de incubação e norma correspondente.

Microrganismo	Método	Meio	Condições de incubação		Limite de detecção	Norma Padrão
			Temperatura	Tempo		
Microrganismos a 30° C	Incorporação	PCA	30 °C $\pm$ 1 °C	72 $\pm$ 3 horas	1,0X10 <sup>1</sup> UFC/g	NP 4405: 2002 ISO 6887; ISO 7218 ISO/TS 11133-1
Bactérias coliformes a 30° C	Incorporação	VRBL	30°C	24 $\pm$ 2 horas	1,0X10 <sup>1</sup> UFC/g	NP 3788:1990 ISO 6887; ISO 7218 ISO/TS 11133-1
Enterobactérias	Incorporação	VRBG	37°C $\pm$ 1°C.	24 horas	1,0X10 <sup>1</sup> UFC/g	NP 4137:1991
Bolores e Leveduras a 25°C	Incorporação	DRBC	25 °C $\pm$ 1 °C	5 dias	1,0X10 <sup>2</sup> UFC/g	prNP 3277-1:2002
<i>E. coli</i> $\beta$ -glucuronidase positiva	Incorporação	TBX	44 °C $\pm$ 1 °C	18 a 24 horas	1,0X10 <sup>1</sup> UFC/g	ISO 16649-2:2001
<i>Listeria monocytogenes</i>	Espalhamento	ALOA	37 °C	24 $\pm$ 2 horas	1,0X10 <sup>2</sup> UFC/g	ISO 11290-2 ISO 16649-2:2001; ISO 6887-1:1999;
<i>Staphylococcus coagulase positivos</i>	Espalhamento	BP	37 $\pm$ 1 °C	24 $\pm$ 2 horas	1,0X10 <sup>2</sup> UFC/g	ISO 6888-1:1999 NP 4400-1:2002; ISO 6887-1:1999 NP 2079:1989NP 1828:1982 NP 1829:1982

Geralmente, a contagem do número total de colónias ou de colónias típicas é realizada utilizando a seguinte equação (1) :

$$(1) N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

Onde:  $\sum C$  consiste na soma das colónias contadas em duas diluições sucessivas da amostra;  $V$ , volume de inóculo em mililitros;  $n_1$ , o número de placas contadas na primeira diluição;  $n_2$ , o número de placas contadas na segunda diluição;  $d$ , a primeira diluição. Quando não se verifica crescimento o resultado deve ser expresso como inferior a  $1 \times d$  por ml ou por g da amostra.

Alguns dos métodos, como o ensaio de contagem da *Listeria monocytogenes* e contagem de colónias de bactérias *Staphylococcus* coagulase positiva, possuem procedimentos diferentes dos restantes, uma vez que os testes de confirmação de colónias necessitam de outras fórmulas de cálculo.

## **II.3.2 Análise de águas**

### **II.3.2.1 Tipos de amostras e estabelecimentos**

Durante o estágio, foram recolhidas 107 amostras de água, mas apenas a partir do dia 21/03/2014 é que o laboratório conseguiu a creditação e começou a realizar as análises no laboratório; antes eram subcontratadas. As águas foram recolhidas de várias empresas de restauração ou de clientes esporádicos e são águas utilizadas para consumo humano ou utilizadas na preparação de produtos na Indústria Alimentar, sendo ambas recolhidas de várias zonas de produção ou zonas de higienização dos manipuladores.

### **II.3.2.2 Recolha**

No caso das águas, a sua recolha é mais rigorosa que nos alimentos e zaragatoas, uma vez que é necessário que a recolha seja bem executada para a amostra não ser contaminada durante a recolha. O procedimento consiste em desinfetar a torneira, por onde se vai tirar a água, com álcool etílico, seguido de uma passagem por chama. Deve-se ter o cuidado de

verificar se a torneira possui alguma peça em plástico que possa inflamar-se e, se tal acontecer, deve-se, se possível, retirar essas peças. De seguida, deixa-se correr a água durante 15 segundos e então a água é recolhida para uma garrafa própria de plástico estéril. Se a água foi tratada com cloro, deverão ser usados recipientes que, além de limpos e esterilizados, têm de ter uma quantidade de tiosulfato de sódio com uma concentração final capaz de inativar o cloro residual. A água é mantida numa arca térmica com termoacumuladores e faz-se a leitura da temperatura da água no início da recolha e na chegada do laboratório. As análises das águas devem ser feitas, se possível, imediatamente após a recolha. Em circunstâncias especiais, estas podem ser armazenadas a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ , durante 24 horas antes do exame. As águas não precisam de uma preparação prévia e são recolhidos cerca de 500 ml da amostra para a análise.

No decorrer do estágio, foram realizadas 818 análises a águas para consumo humano, sendo que apenas 34 amostras de águas foram analisadas pelo laboratório. Só a partir do dia 21/03/2014 é que o laboratório foi acreditado para estas análises, pelo que só efetuei, no máximo, análises a cinco águas, pois esta análise foi feita, normalmente, quando efetuava a preparação dos meios. Já na análise de microrganismos a  $22^{\circ}\text{C}$  e a  $37^{\circ}\text{C}$  realizei um maior número de análises (10 análises), uma vez que estas eram feitas no dia da recolha. Na tabela 7, encontram-se as análises realizadas por parâmetros.

Tabela 7- Análises realizadas, no decorrer do estágio, a águas para consumo humano para os diversos parâmetros analisados.

### Águas

Parâmetro analisado	Análises realizadas
Bactérias coliformes totais	109
<i>Clostridium perfringes</i>	55
<i>Enterococos</i>	153
Microrganismos a $22^{\circ}\text{C}$	147
Microrganismos a $37^{\circ}\text{C}$	164
<i>E. coli</i>	190

#### II.3.2.3 Procedimento das análises efetuadas a águas no laboratório YourLab S.A.

Nos ensaios de enumeração de microrganismos em águas, apenas dois parâmetros são realizados por incorporação (microrganismos a  $22^{\circ}\text{C}$  e a  $37^{\circ}\text{C}$ ), enquanto que os outros

parâmetros são realizados através do método de filtração (Figura 12). Neste filtram-se 100 mL da amostra em estudo, usando um filtro de membrana, que é inoculado, futuramente, num meio seletivo, em condições de incubação específicas para cada microrganismo, como descrito na tabela 8. Por sua vez, o método por incorporação consiste em inocular 1mL da amostra em meio YEA, à temperatura e duração específica de cada análise. Ambos os resultados são expressos em UFC/mL de amostra.

Tabela 8 – Resumo de métodos de enumeração de microrganismos em águas: princípio do método, meio de cultura utilizada, condições de incubação e norma correspondente

Águas						
Microrganismo	Método	Meio	Condições de incubação		Limite de detecção	Norma Padrão
			Temperatura	Tempo		
Contagem de microrganismos a 36°C e 22°C	Incorporação	YEA	36 °C ±2 °C 22 °C ±2 °C	44 ±4 horas 68 ±4 horas	1 UFC/ml	ISO 6222:1999
<i>Clostridium</i> sulfito-redutores	Filtração	TSCA	44 °C ± 1°C	21 ± 3 horas	1 UFC/100 ml	EA 2010 Part 6
<i>Escherichia coli</i> e bactérias coliformes	Filtração	TTC	36 °C ± 2°C	21 ± 3 horas	1 UFC/100 ml	ISO 9308-1:2000
<i>Enterococcus</i> intestinais	Filtração	Slanetz e Bartley	36 °C ± 2°C	44 ± 4 horas	1 UFC/100 ml	ISO 7899-2:2013



Figura 12- Rampa de filtração usada na análise dos vários parâmetros em águas no laboratório Yourlab S.A.

### II.3.3 Análise de zaragatoas

As zaragatoas foram feitas a manipuladores e a superfícies. Estas serviram para controlo de higienização, tanto das mãos dos manipuladores como utensílios e superfícies que possam entrar em contacto com os alimentos. As zaragatoas devem ser feitas respeitando

uma determinada área, normalmente 25 cm<sup>2</sup>, de modo a, no fim da análise, ser feita a contabilização do número de microrganismos por área analisada.

Os procedimentos de amostragem e análise de zaragatoas seguem a norma padrão ISO 18953:2004 “*Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs*”. Conforme esta norma, é analisada a solução presente na zaragatoa a analisar e, se necessário, são feitas diluições. Durante o estágio, foram recolhidas e analisadas 1415 zaragatoas, sendo 996 análises a zaragatoas de microrganismos a 30°C e 419 análises de Enterobactérias. Destas análises, só realizei cerca de 20 análises, uma vez que esta análise era feita em simultâneo com a preparação das amostras, trabalho que era da minha competência, durante o estágio.

### II.3.3.1 Procedimento

No laboratório, a análise de zaragatoas abrange apenas os ensaios de contagem de microrganismos a 30°C e a contagem de Enterobactérias. Na tabela 9, encontram-se descritos os métodos e as normas padrão utilizadas. Nos ensaios em que são utilizados meios seletivos, como no ensaio das Enterobactérias, as colónias características são, posteriormente, confirmadas bioquimicamente. Neste caso, o número de unidades formadoras de colónias por cm<sup>2</sup>, ou por zaragatoa, é calculado de acordo com o número de colónias confirmadas. No cálculo do número de microrganismos por cm<sup>2</sup> de superfície a analisar (*N<sub>s</sub>*), utiliza-se a seguinte equação (2):

$$(2)N_s = \frac{N \times F}{A} \times D$$

Onde: N representa o nº de UFC por 1mL de diluente; F, a quantidade em mL, de diluente na zaragatoa; A, a área da superfície examinada em cm<sup>2</sup>; D, a diluição efetuada.

Tabela 9 – Resumo dos métodos de enumeração de microrganismos a zaragatoas: princípio do método, meio de cultura utilizada, condições de incubação, limite de deteção e norma correspondente.

#### Zaragatoas

Microrganismo	Método	Meio	Condições de incubação		Limite de deteção	Norma Padrão
			Temperatura	Tempo		
Microrganismos a 30° C	Incorporação	PCA	30 °C ±1 °C	72 ±3 horas	101 UFC/g	ISO 4833:2003
Enterobactérias	Incorporação	VRB G	37°C±1°C.	24 horas	101 UFC/g	ISO 21528-2: 2004

## **II.4 Caso de estudo – Avaliação da relação entre a higienização de manipuladores e superfícies e a contaminação do produto final em pequenas indústrias alimentares**

### **II.4.1 Introdução – O problema em estudo**

Esta secção tem como objetivo a avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos através dos resultados das análises microbiológicas efetuadas em estabelecimentos que possuem fabrico próprio ou manipulem alimentos processados ou não, de modo a observar se existe alguma ligação entre a contaminação dos manipuladores e bancadas com a contaminação do produto.

Este trabalho consistiu na avaliação da contaminação dos manipuladores e superfícies e a contaminação do produto final. Os dados utilizados são referentes ao período de 2011 a 2014, sendo que a maioria dos dados utilizados não correspondem ao período do estágio curricular. A utilização de um número maior de dados irá permitir um aumento de credibilidade e significância das conclusões tiradas deste estudo.

A recolha e o transporte de algumas amostras utilizadas para o estudo foram feitas pelo laboratório YourLab Segurança Alimentar e outras foram entregues no laboratório diretamente pelo cliente interessado. Ambos foram realizados com base em metodologias e exigências das normas Europeias.

### **II.4.2 Tipos de amostras e estabelecimentos**

Os estabelecimentos de onde foram recolhidas as amostras incluíram várias empresas de restauração, como cafés, restaurantes, hotéis, empresas alimentares, entre outras, como já referido no ponto II.1. Os produtos variaram entre produtos confeccionados e produtos frescos. As amostras consideradas para o estudo foram todas aquelas em que se realizou análise ao produto e, em simultâneo, a zaragoas de manipuladores e/ou superfícies. Dentro das amostras de zaragoas e alimentos recolhidas em simultâneo, avaliou-se apenas o parâmetro de microrganismos a 30°C, de modo a ser possível retirar alguma correlação entre a contaminação da zaragatoa e do produto final.

## II.4.3 Procedimento da análise de enumeração de microrganismos a 30°C nos alimentos e nas zaragatoas

### II.4.3.1 Análise de Microrganismos a 30 °C em Alimentos

Na análise de microrganismos a 30°C, é realizada segundo a norma padrão ISO4833:2003 - Método horizontal para a contagem de colónias a 30°C. Nesta faz-se a contagem das colónias que crescem a 30°C, durante 72 horas. O procedimento consiste no método de incorporação utilizando um meio geral, ou seja, permite o crescimento de vários microrganismos. O meio utilizado é o meio PCA. Este procedimento encontra-se descrito na figura 13.

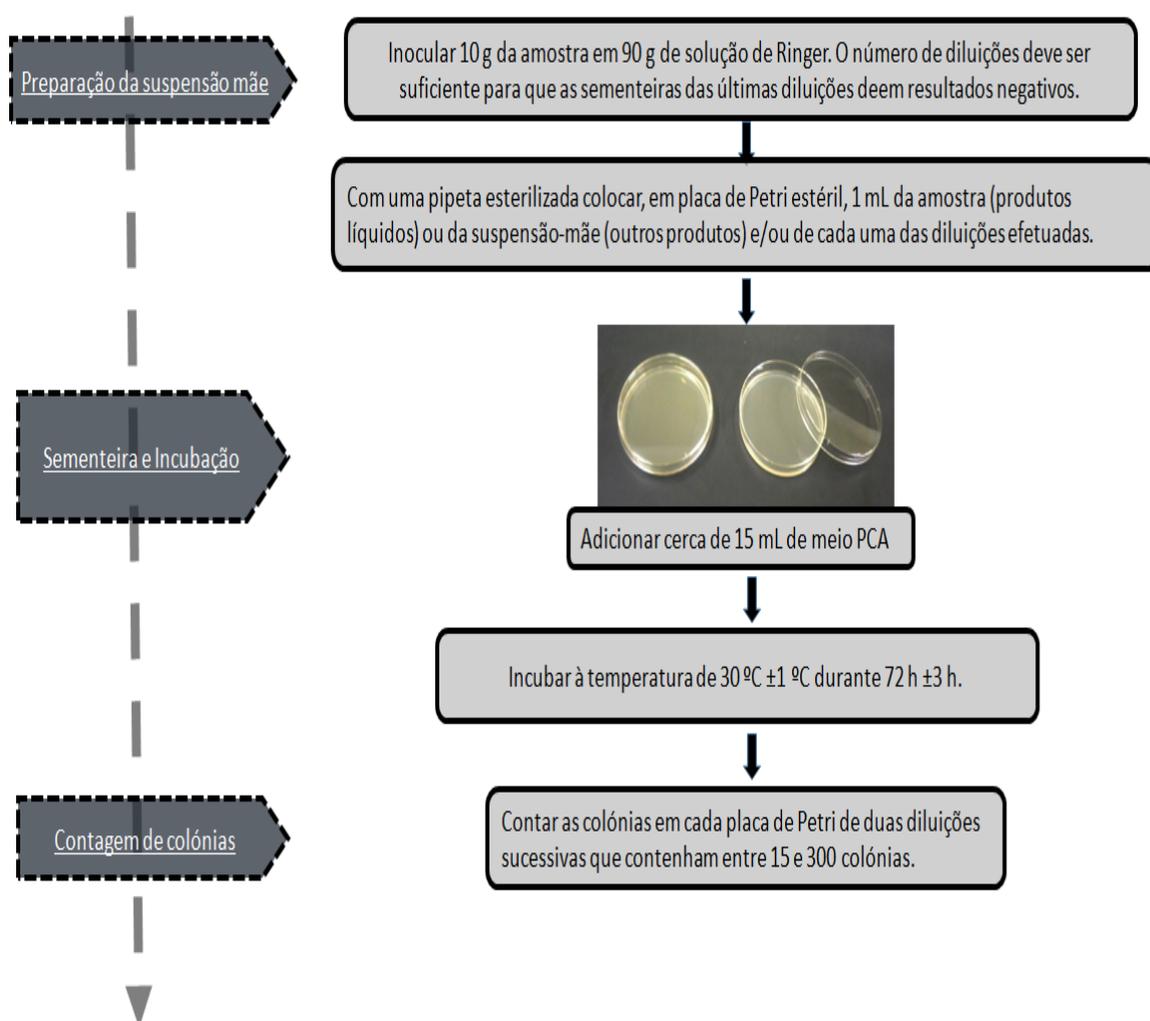


Figura 13– Esquema em síntese da contagem de microrganismos a 30°C, segundo o procedimento padrão descrito na norma ISO 4833:2003 - Método horizontal para a contagem contagem de colónias a 30°C. Sendo PCA, “Plate Count Agar”.

### II.4.3.2 Análise de Microrganismos a 30°C em zaragatoas

A análise de microrganismos a 30° C em zaragatoas é idêntica à análise em alimentos, diferindo na preparação da amostra. Esta análise é feita diretamente da zaragatoa após agitação. O procedimento segue a norma padrão de recolha de amostras em zaragatoas ISO 18593:2004 –“*Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs*” e encontra-se descrito na figura 14.

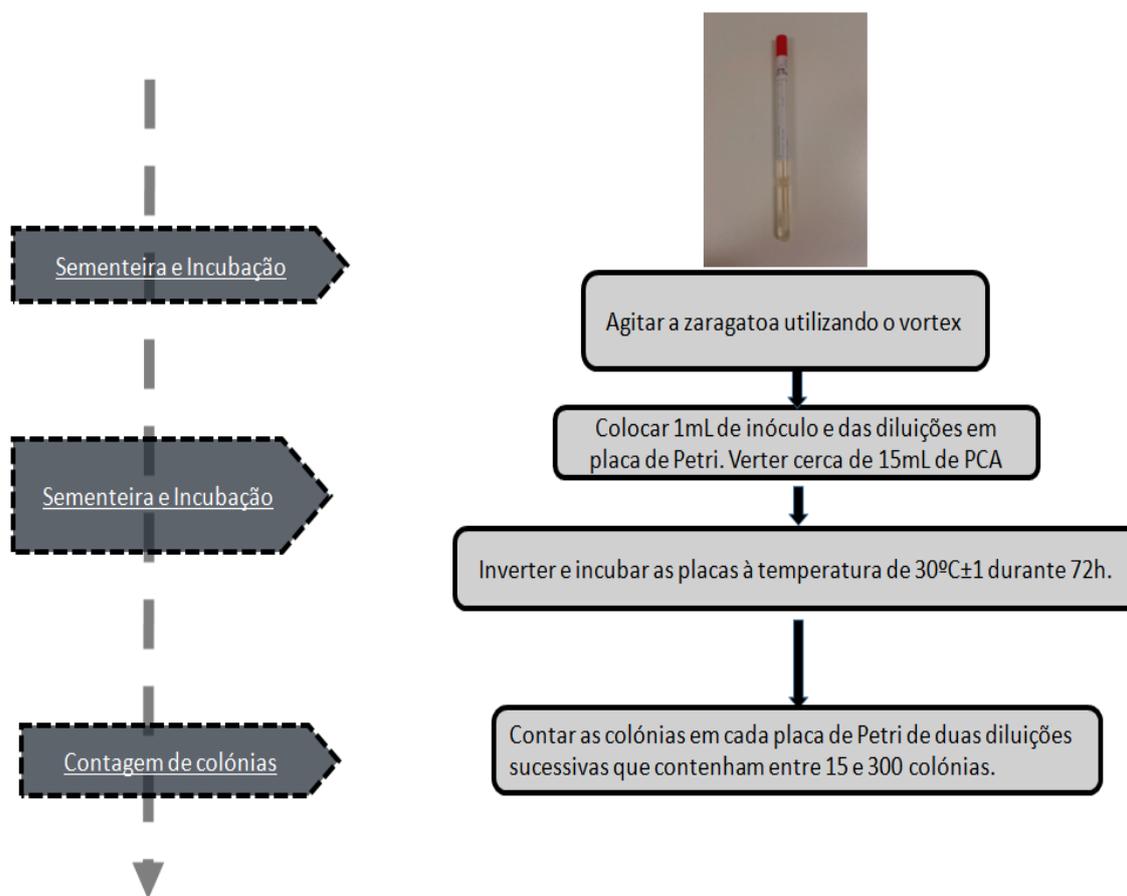


Figura 14– Esquema em síntese da contagem de microrganismos a 30°C, segundo o procedimento padrão descrito na norma ISO 18593:2004 –“*Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs*” e ISO 4833:2003 - Método horizontal para a contagem de microrganismos Contagem de colónias a 30°C.

### II.5 Critérios microbiológicos considerados no estudo

A legislação nacional é omissa para a maioria dos produtos confeccionados, uma vez que estes estão sujeitos a um tratamento térmico. A legislação abrange apenas as classes de produtos frescos, como a carne e produtos derivados, leite e produtos lácteos, ovo e produtos à base de ovo, produtos da pesca, produtos hortícolas, frutas e produtos derivados. No

laboratório YourLab, a maioria das análises é feita a refeições ou alimentos processados. Os produtos confeccionados não possuem critérios microbiológicos estabelecidos por lei.

Como não existe legislação própria, os clientes, neste caso a empresa responsável pelo plano HACCP que contrata o laboratório, é que define os limites e critérios microbiológicos. Neste estudo, de modo a avaliar a qualidade microbiológica das análises efetuadas no decorrer do estágio, utilizaram-se como referência os guias publicados pelos Laboratórios de Microbiologia dos Alimentos do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (Lisboa e Porto). Este guia foi elaborado pela necessidade da existência de valores de referência para avaliação dos resultados obtidos das análises microbiológicas aos alimentos prontos a consumir. Há mais de 30 anos têm vindo a ser desenvolvidos diversos estudos para a realização deste guia. Na tabela 10, encontram-se os valores guias para a avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos cozinhados prontos a consumir.

Tabela 10- Valores guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a consumir, onde \* - Aplicável em produtos conservados no frigorífico; #- Equacionado caso a caso; NA – Não aplicável, adaptado da referencia (27).

Microorganismo	Grupo de alimentos	Qualidade Microbiológica (ufc/g quando não indicado)			
		Satisfatório	Aceitável	Não satisfatório	Inaceitável / potencialmente perigoso
Microorganismos a 30°C	1	$\leq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$	NA
	2	$\leq 10^3$	$> 10^3 \leq 10^5$	$> 10^5$	NA
	3	$\leq 10^4$	$> 10^4 \leq 10^6$	$> 10^6$	NA
Leveduras	1* e 2	$\leq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$	NA
	3	$\leq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^5$	$> 10^5$	NA
Bolores	1* e 2	$\leq 10$	$> 10 \leq 10^2$	$> 10^2$	#
	3	$\leq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^3$	$> 10^3$	#
Coliformes totais	1	$\leq 10$	$> 10 \leq 10^2$	$> 10^2$	NA
	2	$\leq 10$	$> 10 \leq 10^3$	$> 10^3$	NA
	3	$\leq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$	NA
<i>E. coli</i>	1, 2	$< 10$	NA	$\geq 10$	NA
	3	$\leq 10$	$> 10 < 10^2$	$\geq 10^2$	NA
<i>Listeria spp.</i>	1, 2 e 3	$< 10^2$	NA	$\geq 10^2$	NA
Anaeróbios sulfito redutores	1, 2 e 3	$\leq 10$	$> 10 \leq 10^3$	$> 10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$ #
<b>Patogénios</b>					
<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	1, 2 e 3	$< 10^2$	NA	$\geq 10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$
<i>Bacillus cereus</i>	1, 2 e 3	$\geq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^3$	$> 10^3 < 10^5$	$\geq 10^5$
<i>Clostridium perfringens</i>	1, 2 e 3	$< 10$	$\geq 10 \leq 10^3$	$> 10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$
<i>Salmonella spp.</i>	1, 2 e 3	Ausente em 25g			Presente em 25g
<i>Listeria monocytogenes</i>	1, 2 e 3	Ausente em 25g	Presente em 25g $< 10^2$ #	-	$\geq 10^2$
<i>Campylobacter spp.</i>	1, 2 e 3	Ausente em 25g			Presente em 25g
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1, 2 e 3	Ausente em 25g			Presente em 25g
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1, 2 e 3	Ausente em 25g			Presente em 25g

Os resultados analíticos indicam a qualidade microbiológica dos alimentos, sendo que estes são expressos nos termos “Satisfatório”, que indica uma boa qualidade microbiológica, “Aceitável”, que indica que o produto se encontra dentro dos limites estabelecidos, “Não satisfatório”, que mostra que o produto não satisfaz um ou mais dos valores estabelecidos e “Inaceitável/potencialmente perigoso”, que indicam a presença de microrganismos patogênicos ou toxinas que poderão constituir um risco para a saúde pública. Estes casos devem ser comunicados de imediato à unidade onde foi detetado, de modo a serem tomadas as medidas preventivas necessárias (27).

Também existe legislação relativa à bactéria *Salmonella* spp.. Esta bactéria deve estar ausente em 25 gramas, segundo a EN/ISO 6579, para a classe de produtos como carne e produtos derivados, leite e produtos lácteos, ovo e produtos à base de ovo, produtos da pesca, produtos hortícolas, frutas e produtos derivados. Nos produtos confeccionados, como se espera um tratamento térmico, não existe legislação. Em relação à bactéria *Listeria monocytogenes*, a contagem deve ser inferior a 100 UFC/g em alimentos prontos a comer, suscetíveis de permitir o crescimento. Já nos alimentos confeccionados, não existe esta suscetibilidade e devem estar ausentes em 25 gramas, se destinados a lactentes e a pessoas medicamente mais suscetíveis, uma vez que a bactéria em causa progride com mais facilidade em indivíduos imunodeprimidos (28).

Em relação à análise das bactérias Estafilococos coagulase positivo, existe legislação para os queijos fabricados com leite cru, onde a análise deve ser feita a uma amostra constituída por 5 unidades. Para se considerar “satisfatório”, no máximo, duas destas unidades não devem ultrapassar os  $10^5$  UFC/g. Para o queijo curado ou sujeito a tratamento térmico mais baixo que a pasteurização, considerara-se “satisfatório” quando, no máximo, duas unidades das amostras não tenham resultados que ultrapassem valores de 1000 UFC/g. Em relação aos queijos de pasta mole que sejam submetidos a pasteurização ou tratamentos térmicos elevados, os valores não devem ultrapassar as 100 UFC/g (28).

Relativamente ao leite e laticínios, o regulamento (CE) nº 853/2004, que estabelece as regras de higiene específicas para os produtos de origem animal, na Secção IX – III do Anexo III, define os critérios microbiológicos a que estes devem obedecer. Para o leite de vaca, são estabelecidos critérios para a carga microbiológica, avaliando-se o número de mesófilos viáveis totais (MVT) e a contagem de células somáticas (CCS). Para outros leites

que não o de vaca, nomeadamente o leite de pequenos ruminantes, só é definido o critério de carga microbiológica, não havendo qualquer referência a CCS (28).

Nos pescados, o que é imposto pela legislação é que o teor de *E. coli* deve ser igual ou inferior a 230 NPM/100g. Nos produtos hortofrutícolas, faz-se avaliação da *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, sendo que estas devem estar ausentes em 25 gramas. Na análise da bactéria *E. coli*, os resultados não devem passar os 100 a 1000 UFC/g (28).

## **Capítulo III. Resultados e Discussão**

### **III.1 Controlo ambiental**

De 9 meses do decorrer do estágio apenas são apresentados dados de 5 meses, dados esses que me foram concedidos.

Na figura 16 apresentam-se os dados relativos à evolução do número de microrganismos a 30°C, nas várias zonas de trabalho e estufas. Esta análise permite avaliar as condições do ar nas zonas de trabalho do laboratório. Verificou-se que as contagens estiveram sempre abaixo do limite 15 UFC para as diversas áreas e 0 UFC para a câmara de fluxo laminar. As zonas de trabalho que apresentaram maior contaminação foram a sala de preparação de meios e a sala de desinfecção. O motivo que pode explicar a maior contaminação da área de preparação de meios é a existência de resíduos de meios propícios ao crescimento de microrganismos. Já para a área de descontaminação, os resultados são perceptíveis, uma vez que é a área aonde permanecem o material e amostras até irem para o autoclave. Na análise do número de bolores, apenas se verificou contaminação de 1 UFC, no mês de Março, o que demonstra que, ao longo do estágio, o ar se encontrou em condições ótimas de trabalho e análise. Na análise de microrganismos a 30°C, em zaragatoas, todas as zonas apresentaram resultados satisfatórios, nunca ultrapassando os 5 UFC/cm<sup>2</sup>. A zona que apresentou maior contaminação foi a zona de análises, apenas num mês, o que pode ser explicado por uma má higienização antes da análise.

## III.2 Avaliação das amostras analisadas no decorrer do estágio

### III.2.1 Resultados dos alimentos analisados

#### Microrganismos a 30°C

A contagem de microrganismos a 30 °C é um bom indicador da contaminação geral dos produtos. Das 204 amostras analisadas, 85,9% correspondem a contagem de microrganismos a 30°C em alimentos confeccionados, enquanto 14,1% correspondem a produtos frescos. Verificou-se que 40,13% das amostras dos produtos confeccionados apresentaram valores satisfatórios, ou seja, inferiores a  $1,0 \times 10^2$  UFC/g (figura 15).

Em relação aos produtos frescos, apenas 36,17% das amostras apresentaram concentrações de microrganismos a 30°C iguais ou inferiores a  $1,0 \times 10^4$  UFC/g (figura 16). Os produtos frescos apresentam uma percentagem menor de resultados satisfatórios, uma vez que estes não sofrem qualquer tipo de tratamento térmico, quando comparado com os produtos confeccionados.

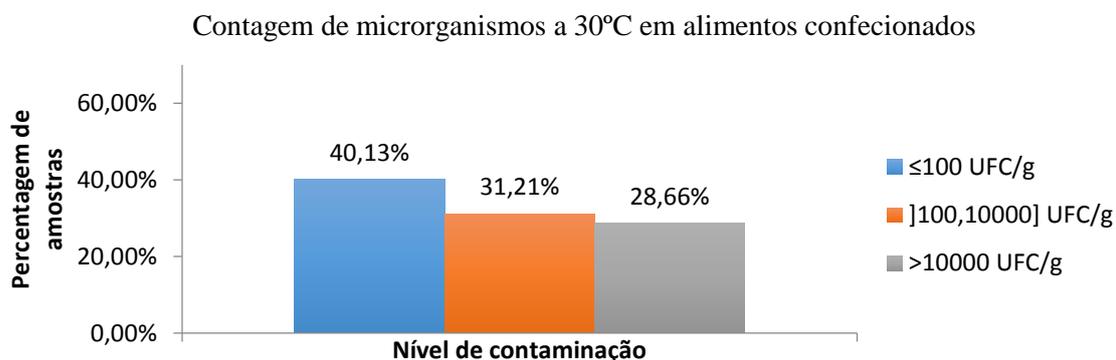


Figura 15- Análise de microrganismos a 30°C em alimentos confeccionados, percentagem das amostras em função dos diferentes limites críticos

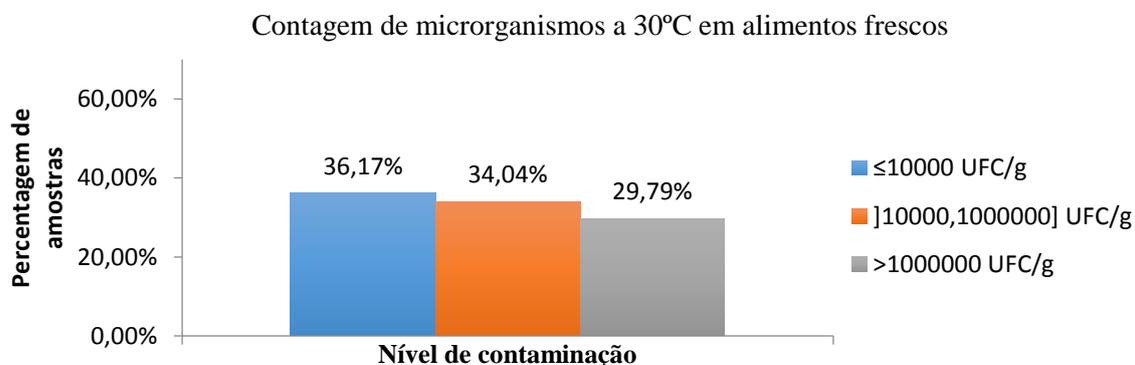


Figura 16- Análise de microrganismos a 30°C em alimentos frescos, percentagem das amostras em função dos diferentes limites críticos.

## ***Enterobactérias***

A contagem de Enterobactérias é um bom indicador da contaminação fecal dos produtos. Foram analisadas 13 amostras, todas correspondentes a contagem de Enterobactérias em alimentos confeccionados. Verificou-se que 92,51% das amostras dos produtos confeccionados apresentaram valores satisfatórios, isto é, inferiores a 10 UFC/g (figura 17).

De facto, a família *Enterobacteriaceae* corresponde a um grupo de bactérias que permite avaliar o estado geral de higiene de um produto alimentar. Todas as bactérias pertencentes a esta família são eliminadas por processos de calor, logo a sua presença em alimentos tratados termicamente traduz uma confeção inadequada ou contaminação pós-processamento por contaminação cruzada (29).

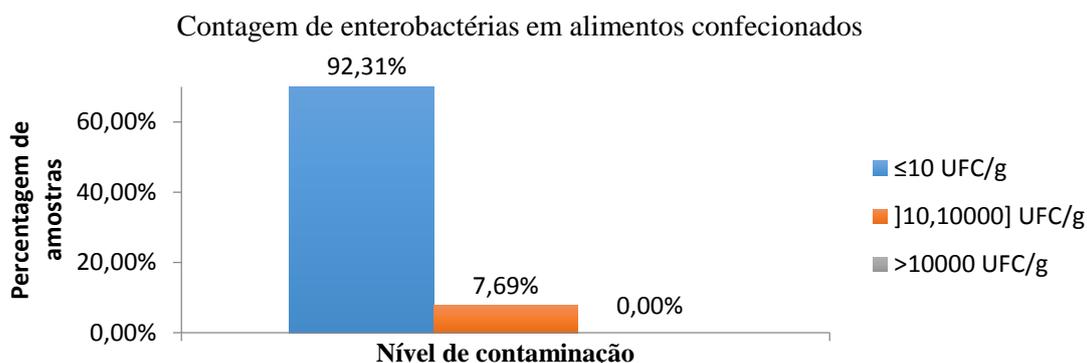


Figura 17- Análise de Enterobactérias em alimentos confeccionados, percentagem das amostras em função dos diferentes limites críticos.

## **Bactérias coliformes**

A contagem de bactérias coliformes é um bom indicador da contaminação fecal dos produtos. Foram analisadas 49 amostras, 80,0% das quais correspondem a contagem de bactérias coliformes em alimentos confeccionados, enquanto 20,0% correspondem a produtos frescos. Verificou-se que 75,61% das amostras dos produtos confeccionados apresentaram valores satisfatórios, ou seja, inferiores a 10 UFC/g (figura 18).

Em relação aos produtos frescos, apenas 37,50% das amostras apresentaram concentrações de bactérias coliformes iguais ou inferiores a  $1,0 \times 10^2$  UFC/g (figura 19). Os produtos frescos apresentam uma percentagem menor de resultados satisfatórios, uma vez que estes não sofrem qualquer tipo de tratamento, quando comparado com os produtos confeccionados.

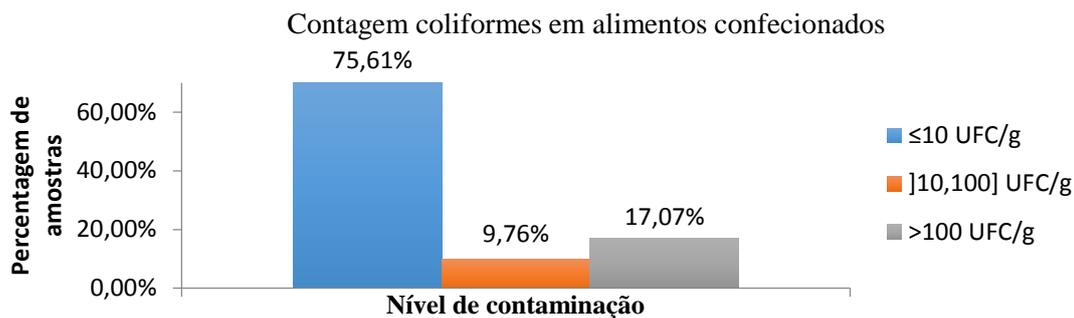


Figura 18- Análise de coliformes em alimentos confeccionados, percentagem das amostras em função dos diferentes limites críticos.

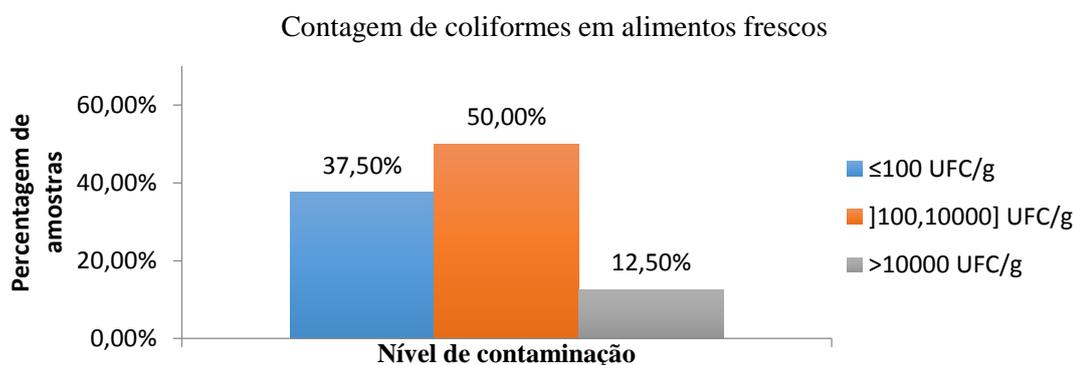


Figura 19- Análise de coliformes em alimentos frescos, percentagem das amostras em função dos diferentes limites críticos.

### ***E. coli* β-glucuronidase**

A contagem da bactéria *E. coli* é usada como indicador da contaminação fecal, fornecendo informação acerca das condições sanitárias e higiénicas. A contaminação ocorre através do consumo de alimentos e água contaminados ou por contaminação cruzada através do contacto direto humano.

Foram analisadas 1778 amostras, sendo que 7,8% das amostras foram extraídas de produtos confeccionados e 92,2% dizem respeito a produtos frescos, uma vez que, destas análises, também fazem parte as amostras efetuadas a carne picada. Verificou-se que, nos produtos confeccionados (Figura 20), 96,59% das amostras apresentaram resultados inferiores a  $1,0 \times 10^1$  UFC/g, ou seja, estavam isentos da bactéria.

Para os produtos frescos (Figura 21), verificou-se que 61,83% das amostras apresentaram resultados satisfatórios, ou seja, inferiores a  $1,0 \times 10^1$  UFC/g, valores inferiores ao limite de deteção do método de ensaio.

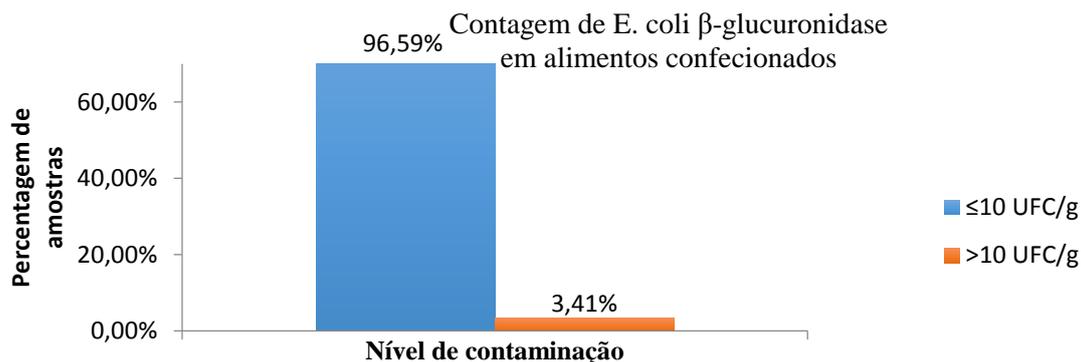


Figura 20- Análise de *E. coli* β-glucuronidase em alimentos confeccionados, percentagem das amostras em função dos diferentes limites críticos.

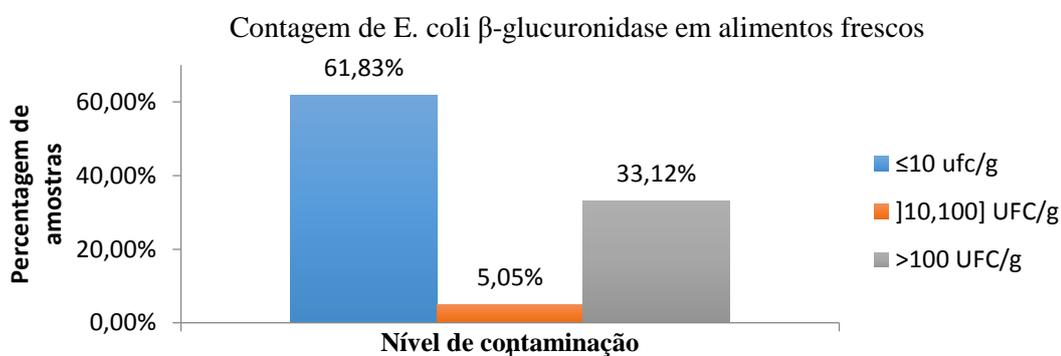


Figura 21- Análise de *E. coli* β-glucuronidase em alimentos frescos, percentagem das amostras em função dos diferentes limites críticos.

### Estafilococos coagulase positiva

Acerca do Estafilococos coagulase positiva, foram realizados 103 ensaios de contagem. Em relação aos produtos confeccionados (Figura 22), 97,85% das amostras apresentaram resultados satisfatórios, ou seja, inferiores a  $1 \times 10^2$  UFC/g. Apenas 2,15% das amostras apresentaram resultados “aceitáveis”, isto é, entre  $1 \times 10^2$  e  $1 \times 10^4$  UFC/g. A contaminação deve-se, provavelmente, à contaminação do manipulador por más práticas de higiene, por bancadas ou utensílios contaminados ou ainda por contaminações cruzadas (29).

Já nas amostras referentes a produtos frescos (Figura 23), 80% das amostras apresentaram resultados inferiores a  $1 \times 10^2$  UFC/g, ou seja, resultados “satisfatórios”. Das amostras de produtos frescos, 20% apresentaram resultados “aceitáveis”. Estas amostras dizem respeito a hambúrgueres e alheiras vegetarianas. Importa realçar que, nestes produtos, a análise foi feita tendo em conta a avaliação do tempo de prateleira, ou seja, foram feitas análises após determinados tempos de preservação.

O processo de eliminação da bactéria através do tratamento térmico é menos eficaz em alimentos secos, com alto teor de gordura e sal. Além disso, as enterotoxinas estafilocócicas são estáveis ao calor e podem sobreviver aos processos normais de cozimento, sendo que a toxina permanece ativa, mesmo na ausência do microrganismo. Outro meio de contaminação dos produtos é o transporte da bactéria *S. aureus* pelos manipuladores, ocorrendo a contaminação de alimentos após o processamento. É importante realçar que se os níveis da bactéria excederem os  $10^5$  UFC/g, em qualquer momento na vida de um alimento, existe o risco de a enterotoxina estar presente em concentrações suficientes para causar doença (29). Nas análises efetuadas no laboratório, nenhuma amostra, nem de produtos frescos nem de produtos confeccionados, ultrapassou valores de  $10^4$  UFC/g.

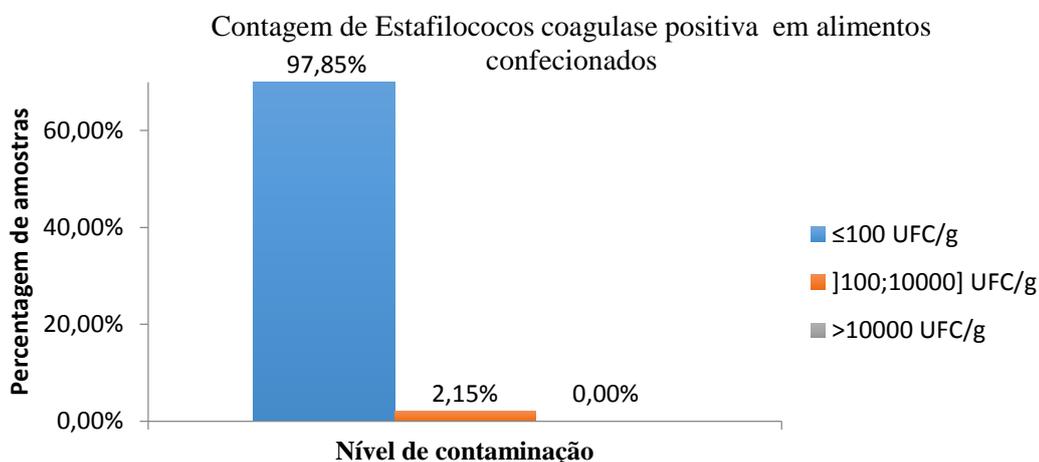


Figura 22- Análise de estafilococos coagulase positiva em alimentos confeccionados, percentagem das amostras em função dos diferentes limites críticos.

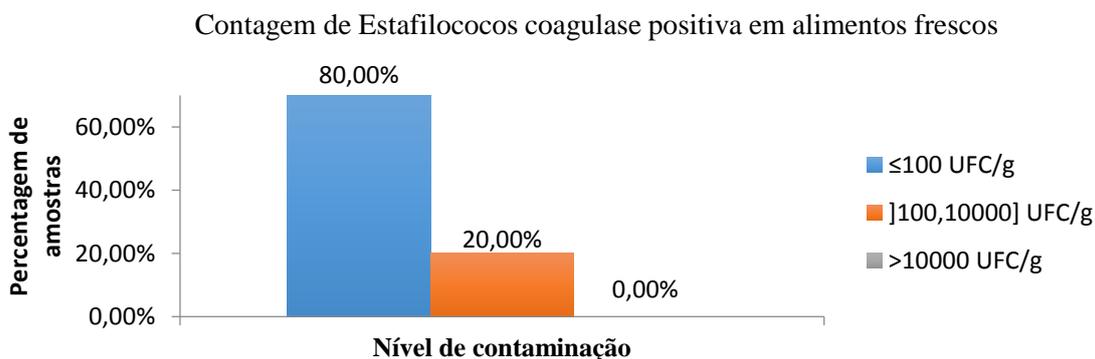


Figura 23- Análise de Estafilococos coagulase positiva em alimentos frescos, percentagem das amostras em função dos diferentes limites críticos.

### **Bactéria *Listeria monocytogenes***

Foram realizadas 47 análises de pesquisa e 46 análises de enumeração da bactéria *Listeria Monocytogenes*. Em relação à contagem da bactéria, apenas uma amostra de um queijo de 8 dias de cura apresentou valores superiores a  $1 \times 10^2$  UFC/g. O resto das amostras apresentou resultados negativos em 25 gramas, tanto na pesquisa como na contagem da bactéria.

Para esta bactéria, não se deve verificar contaminação em alimentos confeccionados, uma vez que estes são sujeitos a tratamento térmico. No entanto, esta bactéria resiste e cresce a temperaturas de refrigeração. A presença da bactéria em alimentos representa um perigo para a saúde pública, principalmente para pessoas com um sistema imunitário debilitado, nomeadamente as grávidas. Caso os alimentos contaminados sejam alimentos sujeitos a tratamento térmico, infere-se que a contaminação ocorreu devido a uma incorreta confeção ou a contaminação cruzada após a confeção (29).

### **Bactéria *Salmonella* spp.**

Foram analisadas 161 amostras para a pesquisa da bactéria *Salmonella* spp. Apenas uma amostra apresentou resultado “presente em 25 gramas”, sendo esta amostra referente a um bolo com creme. Provavelmente, a contaminação desta amostra tem origem numa má confeção, dado que o interior do ovo é um dos principais locais onde se encontra a bactéria. Portanto, entende-se que uma má confeção do ovo ou, neste caso, do creme pode levar a contaminação do produto. Quanto esta bactéria está presente num alimento é alarmante devido à sua elevada patogenicidade, podendo provocar febre tifoide e salmonelose (30).

### **Pesquisa de esporos de *Clostridium* sulfito-redutores**

Foram analisadas 67 amostras para a pesquisa da bactéria. Relativamente às amostras dos produtos confeccionados, obtiveram-se 93,85% de resultados “negativo em 1 grama”. Apenas 2 amostras (uma pizza e um naco de vitela com batatas fritas) apresentaram o resultado “positivo em 1 e negativo em  $10^{-1}$  g” e apenas 1 amostra (pastel de côco) foi “positivo em  $10^{-1}$  g” (Figura 24). Dos dois produtos frescos analisados, no decorrer do estágio, ambos apresentaram valores negativos para pesquisa de esporos *Clostridium* sulfito-redutores.

A intoxicação alimentar pela bactéria *Clostridium perfringes*, associada normalmente a guisados de carne, ocorre após ingestão de um elevado número de células ( $10^6$  a  $10^7$ ) vegetativas viáveis, isto é, capazes de produzir a enterotoxina. Apesar de a cozedura matar as formas vegetativas, não mata os esporos, que germinam após o arrefecimento do produto (31). A presença destas bactérias em elevadas concentrações em alimentos é preocupante, uma vez que, a enterotoxina produzida por esta bactéria causa diarreia e dor abdominal (30).

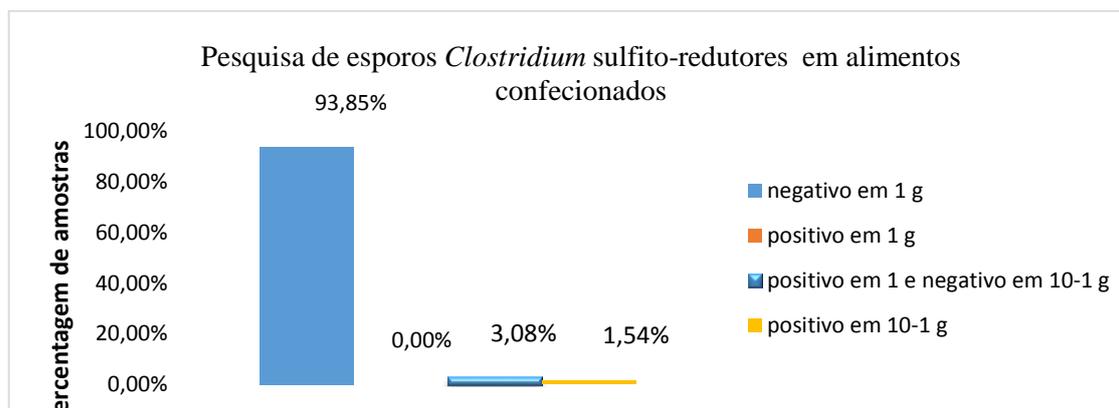


Figura 24- Pesquisa de esporos *Clostridium* sulfito-redutores em alimentos confeccionados, percentagem das amostras em função dos diferentes limites críticos.

Os resultados das análises realizadas durante o estágio podem comparar-se a um estudo realizado com o objetivo de avaliar os padrões de higiene de 44 instalações de serviços de alimentação localizados em Itália, de 2010 a 2011. O objetivo do estudo foi analisar a qualidade microbiológica e a segurança dos alimentos prontos para o consumo (32).

Em relação à bactéria *Listeria monocytogenes*, verificou-se ausência da mesma em todos os alimentos. Já no presente trabalho, a bactéria foi detetada numa amostra de um queijo de 8 dias de cura. Acerca da bactéria *Salmonella* spp., o estudo revelou ausência desta bactéria nos alimentos analisados, enquanto que, neste trabalho, verificou-se a sua presença numa amostra de bolo com creme, provavelmente devido a má confeção do creme de ovo. Ainda no estudo, a análise de *Staphylococcus aureus* revelou percentagens de amostras não conformes ( $>10^2$  UFC) de 2,3% para "alimentos confeccionados" e 9,2% para "produtos frescos". Nas análises efetuadas pelo laboratório, verificou-se que 2,19% das amostras encontravam-se no intervalo de ]10;10000] UFC/g para produtos confeccionados e 20,00%

para produtos frescos, ou seja, a contaminação foi superior, quando comparada com os resultados do estudo. Estes resultados podem dever-se, principalmente, a más práticas de higiene por parte dos manipuladores, pois esta bactéria encontra-se nas narinas e pele dos mesmos.

Em relação à *Escherichia coli*, no estudo verificaram que 6,1% das amostras de "alimentos cozidos e crus" apresentavam resultados insatisfatórios. Já nas análises efetuadas pelo laboratório, os valores foram de 33,12% para as amostras de produtos frescos e 0,00 % para os produtos confeccionados. Porém, uma vez que os resultados do estudo são referentes a produtos crus e confeccionados, não é possível uma comparação de resultados. Para a análise de bactérias coliformes totais, o estudo conclui que 14,3% das amostras realizadas a "alimentos confeccionados" eram insatisfatórias. Nas análises efetuadas no laboratório, 17,07% das amostras apresentaram resultados insatisfatórios, revelando uma contaminação superior quando comparada com a do estudo (32).

### **III.2.2 Resultados das águas analisadas**

No decorrer do estágio foram realizadas 818 análises a águas destinadas ao consumo humano, recolhidas em vários estabelecimentos de restauração. O Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de Agosto, relativo à qualidade da água destinada ao consumo humano, define, segundo o anexo II, os parâmetros e valores paramétricos estabelecidos para critérios microbiológicos e físico-químicos.

Assim, o decreto define que a análise das bactérias *E.coli* e *Enterococos* deve ser igual a 0 UFC/100 ml. Os valores paramétricos estabelecidos, apenas para efeitos de controlo de qualidade da água destinada ao consumo humano, definem para as bactérias coliformes totais, *Clostridium perfringres*, valores iguais 0 UFC/100 ml. Para o número de colónias a 22°C e a 37°C não é desejável que a contagem seja superior a 100 e 20 UFC/100ml, respetivamente. Esses valores podem ser desde que não se verifique uma alteração significativa dos resultados ao longo do histórico de análise.

Na figura 25, encontram-se os resultados da análise dos parâmetros microbiológicos, realizadas no decorrer do estágio.

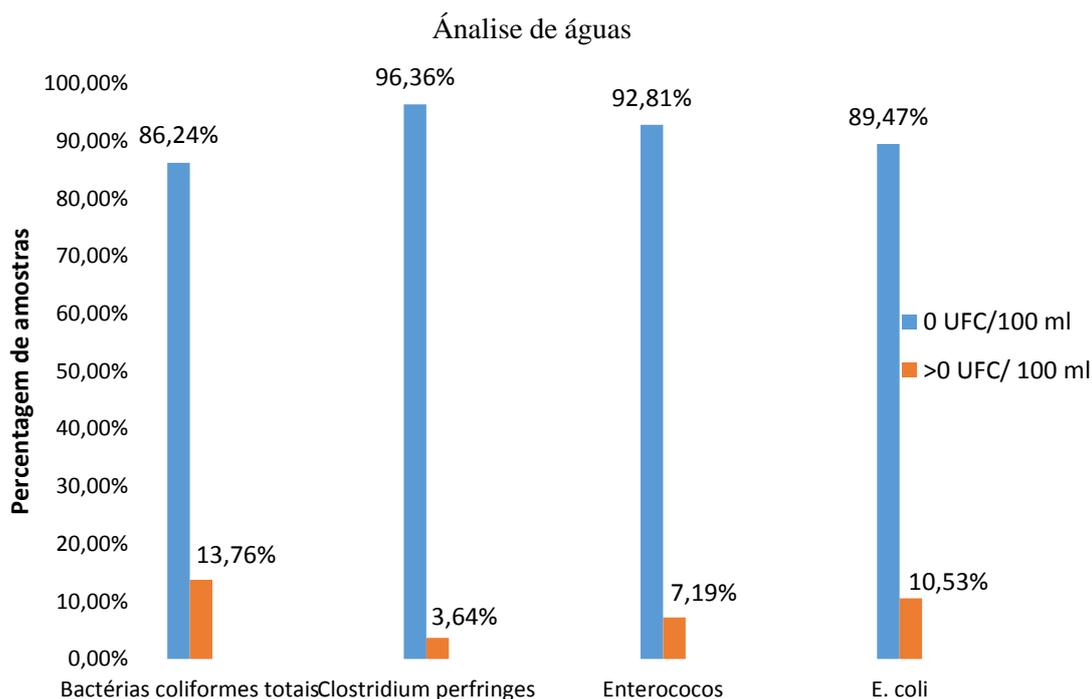


Figura 25- Numero de amostras analisadas bem como os resultados obtidos para os diferentes parâmetros analisados no laboratório no decorrer do estágio em águas para consumo humano.

A análise a bactérias coliformes é usada como indicador de contaminação fecal, tal como a presença da bactéria *E. coli*. Dos resultados obtidos, verifica-se que, em relação à análise de bactérias coliformes totais, 86,24% das amostras apresentam resultados iguais a 0 UFC/100 ml e 13,76% das amostras apresentam resultados superiores.

Já nos ensaios de contagem da bactéria *E. coli*, verificou-se que 89,47% das amostras apresentam resultados iguais a 0 UFC/ml e 10,53% das amostras apresentam resultados superiores. Para a bactéria *enterococos*, em águas para consumo humano, 92,81% obtiveram resultados iguais a 0 UFC/100 ml, ou seja, resultados dentro do limite estabelecido por lei, e apenas 7,19% das amostras ultrapassaram este valor. Em relação à bactéria *Clostridium perfringens*, verificou-se que 96,36% obtiveram resultados iguais a 0 UFC/100 ml e apenas 3,64% das amostras ultrapassaram este valor.

De um modo geral, as águas analisadas apresentaram um elevado número de amostras satisfatórias, o que se deve ao tipo de amostra analisado pois o laboratório analisa e recolhe essencialmente águas de rede tratada. Na figura 26 e 27, encontram-se os resultados das análises a águas para os parâmetros de microrganismos a 37°C e 22°C.

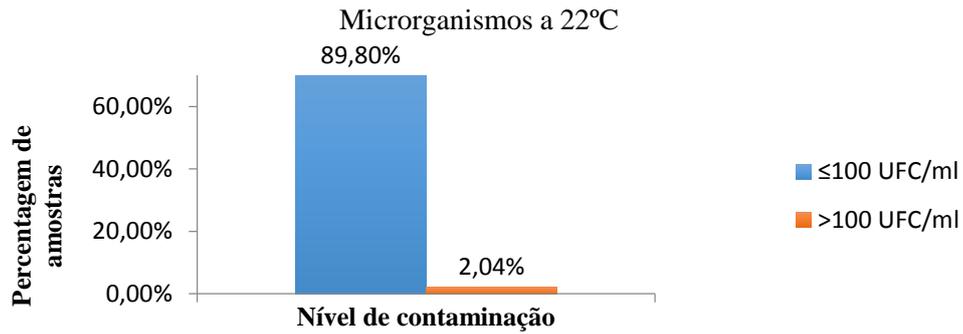


Figura 26- Análise de microrganismos a 22°C em águas para consumo humano, percentagem das amostras em função dos diferentes limites críticos.

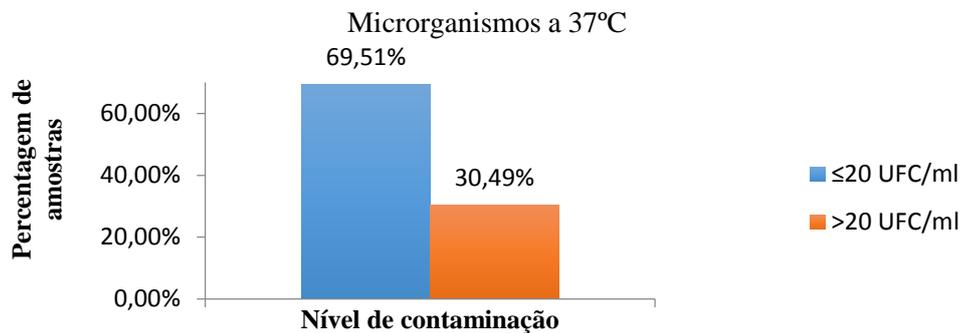


Figura 27- Análise de microrganismos a 37°C em águas para consumo humano, percentagem das amostras em função dos diferentes limites críticos.

A análise de microrganismos a 22°C é usada como indicador da contaminação ambiental, uma vez que esta temperatura aproxima-se da temperatura ambiente. Com esta análise, verificou-se que, das amostras analisadas, 89,80% das amostras apresentaram valores iguais ou inferiores a 100 UFC/ml, ou seja, dentro do limite estabelecido por lei para as águas de consumo humano.

Já a análise à temperatura de 37°C permite avaliar o grau de contaminação fecal, pois é uma temperatura próxima da temperatura ótima para o crescimento de Enterobactérias e outros microrganismos patogénicos. Neste caso, 69,51% das amostras apresentaram valores inferiores ou iguais a 20 UFC/ml. Os resultados permitem verificar que, à temperatura de 37°C, existe menor percentagem de amostras “satisfatórias” indicando que a contaminação das águas analisadas é principalmente proveniente de contaminação fecal. No entanto, nestas análises não existe um limite fixo, mas é desejável que não ultrapasse estes valores, desde que no histórico das análises não se verifique, posteriormente, uma continuação de resultados semelhantes.

### III.2.3 Resultados das zaragoas analisadas

No decorrer do estágio foram realizadas 996 análises de microrganismos a 30°C, em zaragoas, das quais 607 foram realizadas a manipuladores e 389 a utensílios e superfícies. Na figura 28 encontram-se os resultados das análises de microrganismos a 30°C em zaragoas.

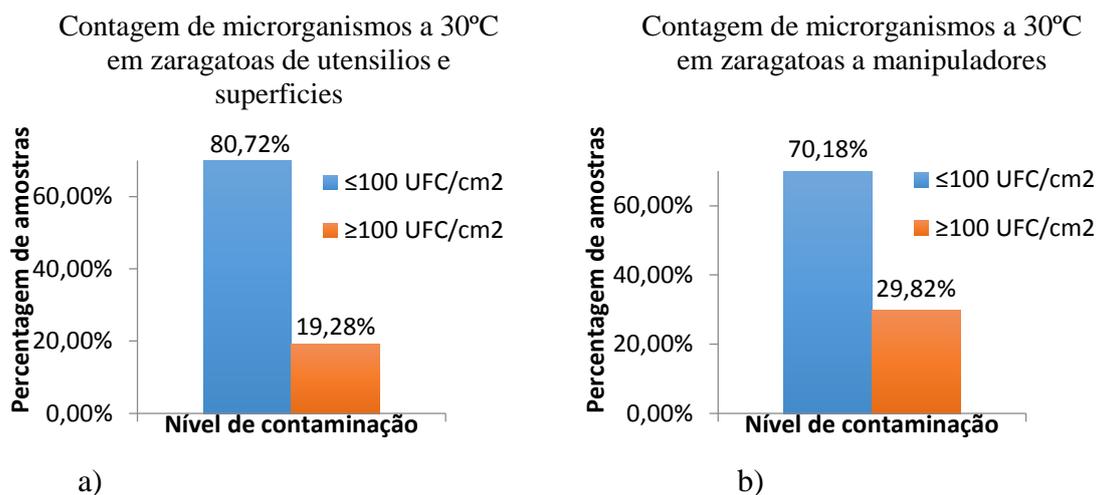


Figura 28- Contagem de microrganismos a 30°C em zaragoas, a) Zaragoas realizadas a manipuladores, b) Zaragoas realizadas a utensílios e superfícies. Percentagem de amostras em função dos limites críticos.

Da análise da enumeração de microrganismos a 30°C em zaragoas, verificou-se que 80,72% das zaragoas realizadas a utensílios e superfícies apresentam resultados “aceitáveis”, isto é, inferiores a  $1 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup>. Apenas 70,18% das amostras relativas a zaragoas a manipuladores apresentam resultados inferiores a  $1 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup>.

Da análise destes resultados percebe-se que, na indústria alimentar, a higienização dos manipuladores ocorre menos eficientemente do que a das bancadas e utensílios. Além disso, todas as zaragoas são recolhidas após higienização, logo a higienização dos manipuladores é feita incorretamente por más práticas de fabrico ou higiene.

No decorrer do estágio, pude observar que na recolha das zaragoas a manipuladores, os funcionários, após a higienização das mãos, não as secavam nos toalhetes próprios. Ao invés disso secavam as mãos a toalhas húmidas já utilizadas para outros fins ou tocavam noutras partes do corpo não higienizadas. O mesmo se verifica nas bancadas e utensílios, cuja higienização não é feita com o detergente específico imposto pela empresa do plano HACCP.

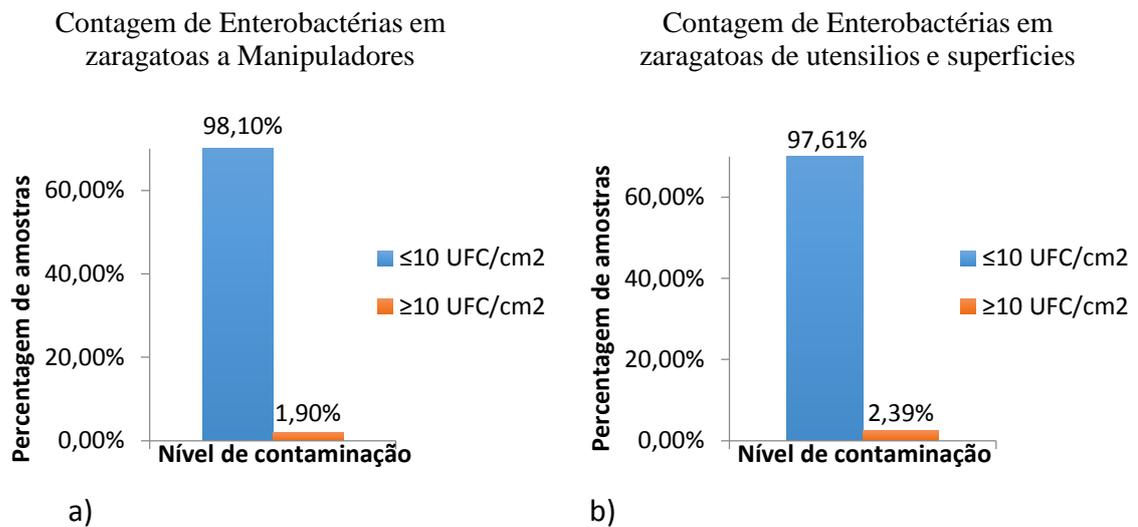


Figura 29- Contagem de Enterobactérias em zaragoas, a) zaragoas realizadas a manipuladores, b) zaragoas realizadas a utensílios e superfícies. Percentagem de amostras em função dos limites críticos.

As análises de Enterobactérias em zaragoas são feitas, maioritariamente, a amostras do cliente de comércio de carne, onde são recolhidas mensalmente, em conjunto com a carne picada. Este cliente considera, para os critérios microbiológicos relativos à contagem de Enterobactérias em zaragoas, um resultado “aceitável” se as contagens forem inferiores a 10 UFC/cm<sup>2</sup>.

Tendo em conta os critérios microbiológicos considerados pelo cliente, verificou-se que 98,10% das zaragoas a manipuladores encontravam-se aceitáveis. Já para as zaragoas a utensílios e superfícies, encontraram-se 97,61% de amostras aceitáveis. Não existe, portanto, uma variação significativa entre zaragoas de manipuladores e utensílios ou superfícies (Figura 29).

### **III.3 Caso de estudo – Resultados da avaliação da relação entre a higienização de manipuladores e superfícies e a contaminação do produto final em pequenas indústrias alimentares**

#### **III.3.1 Avaliação da relação da contaminação das zaragoas e o produto final**

Dos resultados referentes ao período de 2011 a 2014, verificou-se que 33,77% das amostras a zaragoas e produtos, recolhidas simultaneamente, não estavam contaminadas, nem o produto nem a zaragatoa. No entanto, para 21,31% das amostras analisadas, havia uma contaminação simultânea do produto e da zaragatoa.

Estes resultados mostram que, mesmo que as zaragoas sejam recolhidas após a higienização dos manipuladores, existe correlação com a contaminação do produto final. A explicação para tal pode estar relacionada com a falta de sensibilização do pessoal para respeitar as zonas e utensílios definidas para cada tipo de produto e cada etapa da confeção. Além disso, este nível de correlação de contaminação das zaragoas e produtos finais mostra que existe uma falta de conhecimento de práticas de higiene e de práticas de fabrico por parte dos manipuladores. De notar que a maioria dos produtos são confeccionados e as análises feitas após higienização revelam que a contaminação ocorre maioritariamente após confeção por contaminação cruzada, mostrando que o plano HACCP não é rigorosamente seguido.

Das amostras analisadas (Figura 30)., verifica-se que em 21,31% houve contaminação do produto e da zaragatoa. Portanto, se as amostras das zaragoas não fossem recolhidas após higienização, mas sim recolhidas sem aviso, o número de amostras de produtos contaminados correlacionadas com a contaminação do produto final poderia ser maior. Por fim, verificou-se que 34,10% das amostras analisadas apresentaram contaminação da zaragatoa e não do produto final. Uma explicação para tal é o facto de o produto final ser sujeito a um tratamento térmico, reduzindo o grau de contaminação

Relação da contaminação das zaragatoas e o produto final

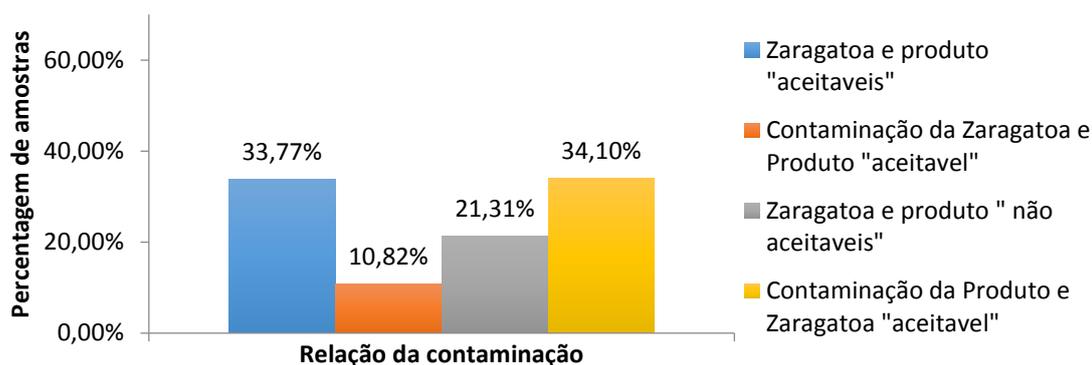


Figura 30- Análise das zaragatoas e produto, percentagem das amostras em que existe contaminação ou do produto ou da zaragatoa em função da contaminação do produto ou da zaragatoa ou de ambos.

Em Portugal, foi realizado um estudo, através de um questionário de escolha múltipla, com o objetivo de avaliar o conhecimento da higiene alimentar de manipuladores de alimentos e profissionais de uma empresa de restauração coletiva.

Os resultados do estudo mostraram uma pontuação média de questões respondidas corretamente de 13 em 23 ( $56,5\% \pm 3,22$ ). Além disso, a percentagem de respostas corretas era significativamente menor em questões relacionadas com o controlo da temperatura, fontes de contaminação e alimentos de alto risco. Os autores concluíram que o nível de conhecimento foi influenciado pelo nível de formação. Os manipuladores de alimentos demonstraram os melhores resultados em questões relacionadas com a limpeza e higienização das instalações, superfícies e utensílios (33).

No entanto, num estudo similar realizado na Irlanda (34), que abordou 200 chefes e gestores responsáveis pela higiene alimentar em estabelecimentos de restauração, revelou resultados que contrariam os obtidos no estudo anterior. Neste estudo, 21% dos inquiridos responderam que a desinfecção das bancadas não constituía um elevado grau de importância em segurança alimentar, o que revela que, apesar dos manipuladores de alimentos terem a formação e o conhecimento necessário, podem não aplicá-los no seu dia-a-dia de trabalho.

Vários estudos na literatura mostram que existem elevadas taxas de transferência de microrganismos de utensílios e bancadas para o produto final, por contaminação cruzada. Um deles avaliou a transferência de *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus* de esponjas de cozinha para tábuas de aço inoxidável e, conseqüentemente, para alimentos. Através da utilização de três concentrações iniciais verificaram que, a altas concentrações iniciais ( $10^7$  CFU/cm<sup>2</sup>) de contaminação, tanto a *Salmonella enteritidis* como o *Staphylococcus aureus* foram recuperados, pelo menos, durante 4 dias num nível de

contaminação alto ( $10^5$  CFU/cm<sup>2</sup>) ou moderado ( $10^3$  CFU/cm<sup>2</sup>). Nos níveis inferiores de concentração inicial, a contaminação das tábuas de corte diminuiu para níveis inferiores ao limite de detecção, em dois dias para a bactéria *Staphylococcus aureus* e em 24 horas para a bactéria *Salmonella enteritidis*. Também observaram que os microrganismos foram transmitidos a partir das esponjas molhadas para as superfícies de aço inoxidável e, posteriormente, para pepinos e filetes de frango, sendo que as taxas de transferência obtidas variaram de 20% a 100% (26).

Outro estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a propagação da bactéria *Salmonella enteritidis* a partir da pele de aves contaminadas ( $5 \log$  UFC/g de concentração inicial), em diferentes tábuas de corte e simulando vários procedimentos de limpeza e desinfecção. Verificaram que a bactéria foi recuperada a partir de todas as superfícies, bem como nos tomates, quando manipulados sem limpeza das tábuas de corte, verificando-se contagens que variaram entre 1,90-2,80 log. Números reduzidos de *S. enteritidis* foram recuperados utilizando outros procedimentos, tanto a partir das superfícies como dos tomates. Além disso, as contagens eram indetetáveis, tanto nas superfícies como nos tomates, após o procedimento de limpeza, seguido de desinfecção, pelo que demonstraram que o uso de hipoclorito, como agente de desinfecção, ajudou a reduzir a contaminação cruzada (35).

### **III.3.2 Percentagem de amostras em que houve contaminação das zaragatoas e do produto final, consoante o tipo de estabelecimento**

Na figura 31, encontram-se os resultados das amostras em que se verificou contaminação, tanto do produto como da Zaragatoa. Os resultados apresentados mostram a percentagem de amostras em que houve contaminação simultânea da zaragatoa e do produto, relativamente ao número total de amostras recolhidas, por tipo de estabelecimento onde foram recolhidas. Verificou-se que os talhos apresentaram uma maior percentagem de amostras contaminadas (cerca de 24,29%), o que constitui uma importante preocupação para a saúde pública. O motivo que pode estar na base desse facto relaciona-se com a maior propensão à contaminação dos produtos frescos, com os quais lidam diariamente. Os mecanismos envolvidos nessa contaminação podem associar-se ao uso prolongado das tábuas de corte, as quais sofrem fissuras de corte, dificultando a correta higienização. Outro exemplo é a utilização da picadora para processamento de carnes, pois dadas as suas

características (várias saliências e pequenas peças de difícil acesso), é difícil higienizá-la corretamente, o que aumenta a suscetibilidade à contaminação.

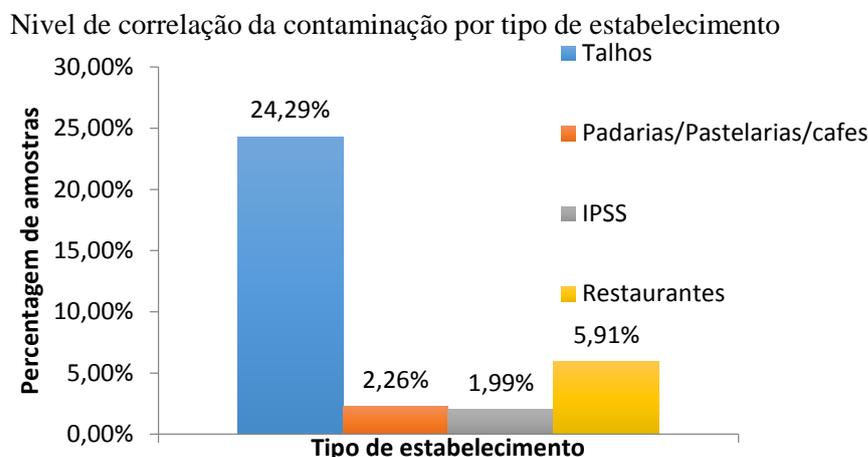


Figura 31- Percentagem de amostras em que se verificou contaminação simultânea do produto e da zaragatoa em função dos tipos de estabelecimentos onde foram recolhidas.

Os restaurantes apresentaram resultados de 5,91% das amostras com correlação de contaminação. De facto, nestes locais, o contacto com produtos crus pode favorecer a contaminação cruzada (por exemplo, contaminar o produto final com a salada crua). Já nas padarias/café, apenas cerca de 2,26% das amostras apresentaram correlação de contaminação. Esta diferença pode explicar-se pelo facto de que, nestes locais, os produtos já estão confeccionados, existindo pouca manipulação posterior à confeção. Além disso, os produtos estão sujeitos a altas temperaturas.

Os IPSS foram os que apresentaram a menor correlação de contaminação, com apenas 1,99% das amostras. Nestes estabelecimentos, os perigos para a saúde pública são maiores, pelo que o pessoal tem mais formação e maior controlo da higienização, pois lidam com pessoas com um sistema imunitário mais debilitado (idosos e crianças), ou seja, com maior risco de desenvolver uma doença infecciosa de origem alimentar.

### III.3.3 Nível de contaminação das zaragatoas relacionada com a contaminação do produto final

Na figura 32 encontram-se os resultados das zaragatoas divididas por zaragatoas a manipuladores e zaragatoas de superfícies e utensílios, ambos com contaminação. Verificou-se que 96,36 % das amostras a manipuladores se encontraram no intervalo das  $1 \times 10^2$  a  $1 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup>, enquanto para a análise a superfícies, utensílios e bancadas foram apenas 38,14% das amostras. Verifica-se que estes resultados podem dever-se à má ou pouco frequente higienização das mãos, à utilização de detergentes inadequados, à incorreta utilização do fardamento e a más práticas de confeção. De notar que a higienização deficiente de equipamentos e utensílios tem sido responsável, isoladamente ou associada a outros fatores, por surtos de doenças de origem alimentar ou por alterações de alimentos processados (26).

Como se pode verificar, existe um maior nível de contaminação nas zaragatoas a superfícies e utensílios. A razão para tal pode ser a má higienização das superfícies, que se permanecerem húmidas e possuírem resíduos de alimentos, podem permitir a adesão de microrganismos. De facto, algumas bactérias aderem às superfícies como estratégia de sobrevivência e podem gerar matriz extracelular, formando biofilmes. A produção dessa matriz confere maior capacidade de resistência à desinfeção, quando comparada com a desinfeção de células em suspensão (24,33).

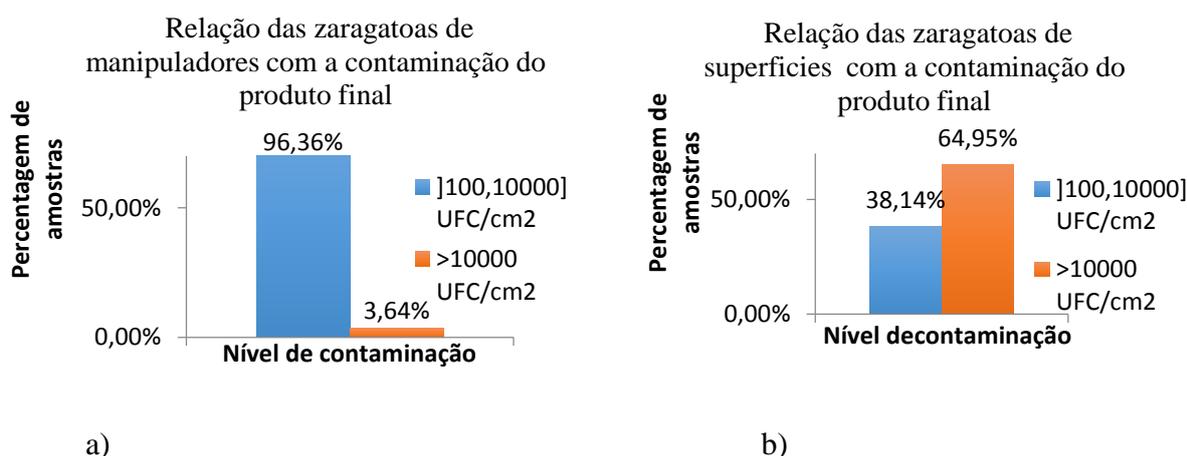


Figura 32- Percentagem de amostras em que se verificou contaminação simultânea do produto e das zaragatoas em função dos limites críticos. a) Zaragatoa a manipuladores, b) Zaragatoa a superfícies e utensílios.

As superfícies e utensílios são uma fonte de contaminação cruzada que está na origem de quase 39% das doenças de origem alimentar. Utensílios como esponjas e toalhas, devido

ao seu uso comum, permitem a dispersão de bactérias sobre várias superfícies, especialmente em utensílios de cozinha e superfícies utilizadas para preparar as refeições. Com o desgastar destes utensílios e equipamentos, ocorre o aparecimento de fissuras que dificultam a higienização (34,35,36).

Em relação à higiene dos manipuladores, não se verificou um nível de contaminação tão elevado, mas estes são um dos principais meios de contaminação cruzada, uma vez que podem facilitar a disseminação dos microrganismos no ambiente de trabalho, em todas as etapas do processo de produção de alimentos (39). Oliveira et al verificaram que as mãos dos cinco manipuladores que participaram no estudo se encontravam contaminadas, sendo que os resultados da contaminação variaram de  $2,6 \times 10^3$  a  $1,4 \times 10^5$  UFC/mãos (40). Çepoğlu et al isolaram 92 espécies de *Staphylococcus* das mãos de 25 manipuladores de alimentos de restaurantes e verificaram que 7 das espécies eram coagulase positiva (41).

### III.3.4 Nível de contaminação dos produtos relacionados com a contaminação das zaragatoas

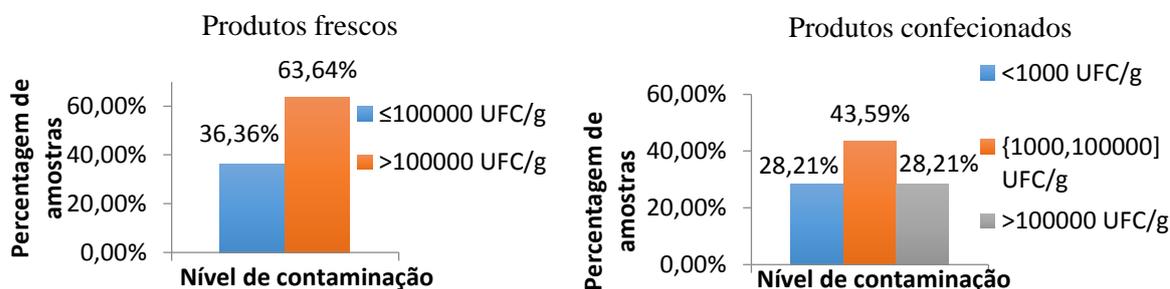


Figura 33- Nível de contaminação dos produtos em que se verificou contaminação simultânea do produto e das Zaragatoas.

Dos produtos analisados relacionados com a contaminação de zaragatoas, verificou-se (figura 33) que, para os produtos frescos, 36,36% das amostras apresentaram resultados inferiores a 100000 UFC/g e 63,64% das amostras apresentaram resultados superiores a 10000 UFC/g. Estes resultados mostram um elevado nível de contaminação dos produtos frescos relacionados com a contaminação de superfícies e utensílios. Para os produtos confeccionados, verificou-se que 28,21% das amostras apresentaram resultados inferiores a 1000 UFC/g, 43,59% das amostras apresentaram resultados entre os 1000 a 100000 UFC/g e 28,21% das amostras apresentaram resultados superiores a 100000 UFC/g.

Tanto nos produtos frescos como nos confeccionados, verificou-se um elevado nível de contaminação. Nos produtos confeccionados, 28,21% das amostras apresentaram resultados superiores a 100000 UFC/g, o que é preocupante, uma vez que estes produtos sofrem um tratamento térmico. Estes resultados mostram que a contaminação dos produtos ocorre, maioritariamente, por contaminação cruzada.

Complementando o que já foi referido, ao longo do estágio pude observar que muitos manipuladores não realizavam a higienização de forma correta, limpando as mãos a panos e toalhas molhadas, realizando a higienização e de seguida tocarem com as mãos em partes do corpo, por exemplo no cabelo. Todos estes resultados mostram a importância de se realizar uma avaliação preliminar das necessidades de formação dos manipuladores e eficácia da mesma.

## **Conclusão**

Relativamente à primeira parte desta dissertação, referente às análises realizadas no decorrer do estágio, verificou-se que, nas análises a alimentos, não foram detetados microrganismos patogénicos na maioria das amostras. A bactéria *Listeria monocytogenes* esteve presente em apenas numa amostra, correspondente a um queijo de 8 dias de cura. Na análise de pesquisa da bactéria *Salmonella* spp., verificou-se a sua presença em apenas uma amostra de bolo com creme. Este resultado é preocupante, uma vez que o tempo de análise é de 5 dias, não podendo prevenir o estabelecimento, de modo a evitar possíveis contaminações pelos clientes que consumam produtos semelhantes. Na análise de *Clostridium* sulfito-redutores, duas amostras apresentaram resultados “positivo em 1g e negativo em  $10^{-1}$  g”, referentes a uma piza e a um naco de vitela com batatas fritas, e uma amostra foi “positivo em  $10^{-1}$  g”, referente a um pastel de coco. Verificou-se um elevado número de contaminação de produtos confeccionados. Deste modo, pode-se concluir que houve contaminação posterior à confeção, por contaminação cruzada devido a más práticas de fabrico e higiene ou devido a uma incorreta confeção. Esta contaminação tão elevada deve-se, provavelmente, a más práticas de higiene e à lavagem inadequada de utensílios, bancadas e mãos dos manipuladores de alimentos. Pode ter ocorrido, também, contaminação por más práticas de fabrico por parte dos manipuladores de alimentos. Exemplo disso é a exposição dos alimentos a temperaturas inadequadas e propícias ao crescimento de

microrganismos patogénicos ou o armazenamento de produtos frescos em fase de descongelamento próximo de produtos confeccionados.

Na análise a águas, os resultados obtidos mostraram uma elevada percentagem de amostras com resultados “satisfatórios”. Estes resultados devem-se ao facto de a recolha das águas ser, maioritariamente, proveniente de redes de água tratadas. Já na análise dos parâmetros contagem de microrganismos a 22°C e 37°C em águas, verificou-se uma maior percentagem de amostras consideradas “satisfatórios” à temperatura de 22°C. Daqui se conclui que, nas análises a águas, a contaminação detetada é sobretudo de origem fecal.

Na análise de zaragoas, verificou-se que, para o parâmetro microrganismos a 30°C, 80,72% das zaragoas realizadas a utensílios e superfícies apresentaram resultados “satisfatórios” e apenas 70,18% das realizadas a manipuladores apresentaram resultados inferiores a  $1 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup>, o que revela maior falta de conhecimento de práticas de higiene do manipulador do que nos utensílios e bancadas. Pode-se concluir que os manipuladores de alimentos podem não ter formação e o conhecimento necessário ou, se os têm, não são praticados no dia-a-dia de trabalho, como pode observar ao longo do estágio. Assim, entende-se que é necessária uma avaliação preliminar das necessidades de formação e eficácia da mesma.

A segunda parte da dissertação, referente à análise de microrganismos a 30°C nos alimentos e nas zaragoas, teve como objetivo avaliar se existe alguma correlação na contaminação dos manipuladores, utensílios e bancadas na contaminação do produto final. Verificou-se que 21,31% das amostras dos produtos e zaragoas estavam contaminadas em simultâneo, mesmo com as análises a zaragoas serem efetuadas após higienização. Deste modo, pode-se concluir que existe uma correlação entre contaminação das mãos dos manipuladores e superfícies e utensílios, mesmo após higienização. Portanto, pode inferir-se que o plano HACCP não é seguido com rigor nas pequenas indústrias alimentares.

Dentro dos produtos contaminados, verificou-se que a correlação da contaminação era maior em talhos, seguidos dos restaurantes, padarias e, por fim, as IPSSs. Os talhos apresentaram um maior nível de correlação, uma vez que lidam com produtos frescos e a contaminação é mais propícia ou porque o aparecimento de fissuras nas tábuas de corte, após longos períodos de uso, levam a uma difícil higiene, o que favorece a ocorrência de contaminações cruzadas. Nos restaurantes, as razões que favorecem a contaminação cruzada incluem a utilização de produtos crus e o desrespeito, por parte dos manipuladores, das zonas

e utensílios definidos para cada tipo de produto e cada etapa da confeção. Nas IPSS, verificou-se uma menor percentagem de produtos contaminados devido a um nível de formação superior dos funcionários, uma vez que os utentes destes estabelecimentos possuem um sistema imunitário mais debilitado, logo mais propício a obter doenças. Dentro das zaragoas analisadas relacionadas com a contaminação do produto final, verificou-se um menor nível de contaminação nas zaragoas efetuadas a manipuladores, com 96,36% das amostras com resultados contidos no intervalo das  $1 \times 10^2$  a  $1 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup>, enquanto que, para a análise a superfícies e utensílios/bancadas foram apenas 38,14% das amostras. Deste modo, conclui-se que a contaminação das mãos dos manipuladores não necessita de ser tão elevada para que haja contaminação do produto final. Esta diferença pode dever-se à má ou pouco frequente higienização das mãos, à utilização de detergentes inadequados, à incorreta utilização do fardamento e a más práticas de confeção.

Por fim, importa realçar que o plano HACCP não está a ser seguido rigorosamente, pois o número de amostras contaminadas de produtos confeccionados é preocupante. Isto revela que existe falta de conhecimentos básicos como boas práticas de fabrico e boas práticas de higiene, por parte dos manipuladores. Como tal, é de extrema importância que exista uma verificação mais rigorosa e frequente do plano em questão, a qual se deve focar, principalmente, no nível de conhecimento das normas de higiene e segurança alimentar, bem como no respeito perante as mesmas, por parte dos manipuladores de alimentos.

## Bibliografia

1. Baptista P, Linhares M. Higiene e Segurança Alimentar na Restauração - Volume I - Iniciação. Guimarães: Forvisão - Consultoria em Formação Integrada, S.A.; 2005.
2. Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. Perfil de Risco dos Principais Alimentos Consumidos em Portugal. Lisboa: Ministério da Economia e Inovação; 2009.
3. Roberts CA. The Food Safety Information Handbook. Westport: Greenwood Publishing Group, Inc.; 2001.
4. Baptista P, Antunes C. Higiene e Segurança Alimentar na Restauração VOLUME II - Avançado ficha técnica. Guimarães: Forvisão - Consultoria em Formação Integrada, S.A.; 2005.
5. Baptista P, Venâncio A. Os Perigos para a Segurança Alimentar no Processamento de Alimentos. Guimarães: Forvisão - Consultoria em Formação Integrada, S.A.; 2003.
6. Direcção-Geral da Saúde. Circular Normativa n.º 14/DT. Vigilância e Controlo Das Toxinfecções Alimentares Colectivas. Lisboa; 2001.
7. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses , Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. European Food Safety Authority Journal. 2013;11(4).
8. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. European Food Safety Authority Journal. 2012;10(3):1-442.
9. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. European Food Safety Authority Journal 2014;12.
10. Adams MR, Moss M o. Food Microbiology. 3th ed. Guildford: The Royal Society of Chemistry; 2008.
11. Todd ECD, Greig JD, Bartleson C, Michaels BS. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 6. Transmission and survival of pathogens in the food processing and preparation environment. Journal of Food Protection. 2009:202-19.
12. Bell C, Neaves P, Williams AP. Food microbiology and Laboratory Praticce. Carlton: Blackwell Publishing; 2005.

13. Bonazzi C, Dumoulin E. Quality Changes in Food Materials as Influenced by Drying Processes, in *Modern Drying Technology*. 3th ed. Weinheim; 2011.
14. Harrigan W. *Laboratory Methods in Food Microbiology*. 3th ed. California: Academic Press; 1998.
15. McMeekin TA, editor. *Detecting pathogens in food*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2003.
16. Ray B, Bhłjnia A. *Fundamental food microbiology*. London: 4th ed. CRCPress; 2008.
17. Batista P, Pinheiro G, Alves P. *Sistemas de gestão de Segurança Alimentar*. Guimarães: Forvisão - Consultoria em Formação Integrada, S.A.; 2003.
18. Frost R. The founding of ISO (Willy Kuert), in *Friendship Among Equals*. Suíça; 1997.
19. Bláithín B, Bolton DJ. *Guia para Controlo da Segurança Alimentar em Restaurantes Europeus*. Dublin; 2004.
23. Marriott NG, Gravani RB. *Principles of Food Sanitation*. 5th ed. New York; 2006.
24. Baptista P, Saraiva J. *Higiene Pessoal na Indústria Alimentar*. Guimarães: Forvisão - Consultoria em Formação Integrada, S.A.; 2003.
25. Rossi EM, Scapin D, Tondo EC. Survival and transfer of microorganisms from kitchen sponges to surfaces of stainless steel and polyethylene. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2013;229–34.
26. Kusumaningrum H, Riboldi G, W, C H, R.R. Beumer. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology*. 2003;227–36.
27. M. Santos Isabel, Correia C, Campos MCI, Saraiv MM, Rosário MN. *Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração*. 2005.
28. REGULAMENTO (CE) N.º 1441/2007 DA COMISSÃO de 5 de Dezembro de 2007. *Jornal Oficial da União Europeia*. 2007;12–29.
29. Health Protection Agency. *Guidelines for Assessing the Microbiological Safety of Ready-to-Eat Foods Placed on the Market*. Health Protection Agency. London; 2009.
30. Villar RG, Macek MD, Simons S, Hayes PS, Goldoft MJ, Lewis JH, et al. Infections Linked to Raw-Milk Cheese in Washington State. *Journal American Medical Association* 1999.

31. Byrne B, Scannell AGM, Lyng J, Bolton DJ. An evaluation of *Clostridium perfringens* media. *Food Control*. 2008;19:1091–5.
32. Balzaretto CM, Marzano MA. Prevention of travel-related foodborne diseases : Microbiological risk assessment of food handlers and ready-to-eat foods in northern Italy airport restaurants. *Food Control*. 2013;29: 202–7.
33. Martins RB, Hogg T, Otero JG. Food handlers' knowledge on food hygiene: The case of a catering company in Portugal. *Food Control*. 2012;23:184–90.
34. Marais M, Conraddie N. Small and micro enterprises – aspects of knowledge , attitudes and practices of managers ' and food handlers ' knowledge of food safety in the proximity of Tygerberg Academic Hospital , Western. *South African Journal of Clinical Nutrition*. 2007;20:50–61.
35. Soares VM, Pereira JG, Viana C, Izidoro TB, Bersot LDS, Pinto JPDAN. Transfer of *Salmonella* Enteritidis to four types of surfaces after cleaning procedures and cross-contamination to tomatoes. *Food microbiology*. 2012;30:453–6.
36. Article R. Microbiological contamination in food service importance and control. *Nutrire: Journal of the Brazilian Society for Food and Nutrition*. 2012;78–92.
37. Longaray SM, Cardoso M, Alegre P. Quantification and molecular characterization of salmonella isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2008;529–34.
38. Chen Y, Jackson KM, Chea FP, Schaffner DW. Quantification and Variability Analysis of Bacterial Cross-Contamination Rates in Common Food Service Tasks. *Journal of Food Protection* 2001;64(1):72–80.
39. Green LR, Selman CA, Radke V, Ripley D, Mack JC, Reimann DW, et al. Food Worker Hand Washing Practices : An Observation Study. *Journal of Food Protection* 2006;69:2417–23.
40. Cristina ANA, Oliveira MDE, Santos OC, Aires G, Silva DA. Avaliação das condições higiênico-sanitárias da cozinha do CMEI no município de Rialma-Go. :14–34.
41. Vatansever L. Isolation of Staphylococci from Food Handlers and Investigation of Their Enterotoxigenicity and Susceptibility to Some Antibiotics Gujarat. *Vet World*. 2010;16:1–5.

### **Sites consultados**

20. International Organization for Standardization. Disponível de:  
<http://www.iso.org/iso/home.html>
21. IFS Audit-Portal. Disponível de: <http://www.ifs-certification.com/index.php/en/>
22. British Retail Consortium - Home. Disponível de:  
[http://www.brc.org.uk/brc\\_home.asp](http://www.brc.org.uk/brc_home.asp)

